



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETEÇÃO DA INFEÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP., EM GATOS DA ÁREA
METROPOLITANA DE LISBOA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO (IFI E ELISA) E DE UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR) APLICADA
A CÉLULAS CONJUNTIVAS E A SANGUE.

PATRÍCIA INÊS SANTOS GOMES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Dr. Luís Miguel Caeiro Chambel

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel Caeiro Chambel

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETEÇÃO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP., EM GATOS DA ÁREA
METROPOLITANA DE LISBOA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO (IFI E ELISA) E DE UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR) APLICADA
A CÉLULAS CONJUNTIVAS E A SANGUE.

PATRÍCIA INÊS SANTOS GOMES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Dr. Luís Miguel Caeiro Chambel

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel Caeiro Chambel

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2015

LISBOA

“Até que se ame um animal, uma parte da própria alma permanece adormecida.”

Anatole France

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luís Chambel, por todos os conhecimentos transmitidos, por toda a paciência, pela simpatia e boa disposição!

À Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, por todo o apoio, dedicação e horas despendidas com os “meus pormenores” na realização desta dissertação de mestrado! Por toda a simpatia e compreensão e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais! Um grande obrigada!

Ao Dr. Telmo Nunes, por todas as horas passadas de volta deste trabalho, sem a sua ajuda este trabalho dificilmente chegaria a este ponto final, por toda a paciência e por todas as conversas realistas e animadoras.

Ao Mestre Marcos Santos e à Dra. Lúcia Gomes, por todo o apoio e paciência dedicados à realização das técnicas laboratoriais, pela disponibilidade e simpatia constantes, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho!

Ao Dr. João Alvarez dos Santos, pela simpatia e disponibilidade desde o primeiro minuto de contacto, sem o qual parte deste trabalho não teria sido possível! Obrigada!

À Professora Doutora Berta São Braz, pelo apoio na realização das técnicas laboratoriais e pela simpatia constante

À Dra. Andreia Oliveira da empresa Esteve, por todo o apoio prestado para a realização da técnica serológica ELISA, pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas.

À empresa Esteve, na pessoa do Dr. Jorge Norte, pela oferta dos kits LEISCAN[®] necessários à realização deste trabalho.

Ao Projecto FCT, PTDC/CVT/118566/2010 pelo apoio parcial laboratorial.

À Doutora Carla Maia, pela pronta disponibilidade na cedência de artigos científicos.

Obrigada a toda a equipa do hospital veterinário VetOeiras!

Ao Dr. Rui Ferreira de Almeida, por todos os ensinamentos e por ser um exemplo a seguir, por mostrar que estamos em constante aprendizagem e que nunca devemos ficar satisfeitos quando pensamos ter encontrado todas as respostas! Ao Dr. Luís Chambel e ao Dr. Rui

Almeida, um grande obrigada por me terem aberto as portas da “vossa casa” e da “vossa família”!

A todos as médicas veterinárias por todo o conhecimento partilhado e por toda a paciência... À Carina, por todas as risadas, por seres a primeira a querer ajudar-me, por estares presente nos melhores momentos e nos piores também, obrigada por tudo... À Sílvia, por todas as horas nas ecografias e por todas as explicações e repreensões, por tudo o que me ensinaste, por seres uma ótima pessoa e profissional... À Cláudia, pelas horas a fazer quimioterapia e pelos cuidados a ter, por me ensinar tanto sobre gatos, por me mostrar que eles podem ser muito mais do que pensei, por todo o carinho que depositas no teu trabalho e nos teus pacientes... À Telma, por nunca desistires e lutares pelo melhor, pelo teu cuidado com o conforto em todos os sentidos de todos os animais internados, pela boa disposição em todas as situações... À Sara, pelos ensinamentos sobre exóticos, pela competência demonstrada em todo o trabalho que realizas, por mostrares que se pode ser cada vez melhor... À Ana Lúcia, por ser das melhores enfermeiras que conheci, por puxares por quem queres que aprenda sempre mais, por tudo o que aprendi contigo... Ao Filipe, por todo o apoio em todas as situações do dia-a-dia, por todos os ensinamentos partilhados, pela simpatia desde o primeiro dia, por tudo o que nos deixaste fazer para treinarmos sempre mais... À Paula, por toda a ajuda e conhecimentos partilhados sobre cirurgia e preparação... À Jeni, pela constante simpatia e sorriso no rosto, pelo carinho por todos os animais que entravam no hospital e que sempre te adoravam, és o primeiro rosto que todos os donos viam e por quem todos perguntam quando telefonam... À D. Lurdes, por todo o carinho para com todos os animais e pessoas, pela sua simpatia e carinho para comigo desde o primeiro minuto, pelos húngaros maravilhosos... À Dra. Cristina por todo o conhecimento transmitido de oftalmologia, por toda a paciência e simpatia, por ser uma excelente profissional... À Dra. Carolina, pela boa disposição em todas as ocasiões e por todos os ensinamentos em ecografia... Aos meus companheiros de estágio, Catarina Cardoso, Catarina Faria, Marisa Vicente, Diana Granger e Zé Diogo, por todo o apoio e por todos os conhecimentos partilhados... A toda a equipa, cada um com a sua valência e com a sua personalidade, completam-se, formam um todo, uma família! Litem por isso, por serem cada vez melhores, passar por cima de problemas banais, para darem a todos os animais, que tenham a sorte de vos encontrar pelo caminho, tudo aquilo que eles precisam e merecem! Um grande obrigada a esta grande equipa!!

A todas os colegas que passaram por mim durante estes 6 anos de grande luta, mas também de grandes emoções e felicidades... Mas sobretudo a quem me acompanhou desde o primeiro dia: À Luísa, por ser uma das minhas moças, das minhas melhores amigas, por estar comigo

há tanto tempo que já nem precisamos falar para saber o que se passa, por me apoiares sempre e dares-me os teus conselhos, por seres assim... À Mariana, pela sua luta constante para ser sempre melhor, por me mostrar que não há esforço que não compense, por ser uma guerreira e por ser uma grande amiga... À Cati, por me ter falado no dia das inscrições e desde aí sermos inseparáveis, por todas as horas de explicações, por todos os conhecimentos partilhados, por todas as horas no hospital... À Xana, Carol e Sónia por serem uma agradável surpresa! À Li e à Su por serem sempre tão queridas e divertidas!

Às minhas outras moças: Maria e Rute, por depois de tantos anos, ainda existir o nosso grupinho sempre forte! Por todos os buraquinhos que encontramos para nos revermos e contarmos as novidades... por sempre que nos encontramos, tudo estar na mesma, voltamos aos belos tempos do secundário... por todas as alegrias e tristezas partilhadas... basicamente: por estarem longe mas sempre perto!

Ao Bruno, mais que o meu namorado, o meu melhor amigo, o meu ouvinte e confidente, o amor da minha vida... Que me faz crescer todos os dias como pessoa e profissional... Que me apoia em todas as decisões e caminhos seguidos... Que me demonstra todos os dias que só lutando muito no nosso trabalho poderemos alcançar algo grandioso... Que está sempre aqui para mim!

À minha mãe, por ter tornado esta viagem até aqui possível... Por me ter apoiado em todas as minhas decisões... Por estar sempre aqui, mesmo que em desacordo... Por me dares tudo o que podes e não podes... por me ensinares a ser uma pessoa correta em todas as situações e por toda a educação que me deste... por tudo o que és apesar das maiores dificuldades...

Ao meu irmão, por ser mais que tudo para mim... Por ser pai, irmão, amigo, tudo numa única pessoa... És a pessoa que mais me enche de orgulho... Nunca poderei compensar tudo o que fizeste e fazes por mim... Por todos os conselhos, por seres tão sábio e correto em todas as situações e com todas as pessoas que te rodeiam... Por seres um exemplo a seguir a todos os níveis... Por seres das melhores pessoas que conheço... Por tudo o que aturaste de mim e continuas... Um grande obrigada mano!

Ao meu avô... Que já cá não está para ver a conclusão desta etapa... Que me orgulharia tanto que visses... Infelizmente, partiste cedo demais... MUITÍSSIMO cedo demais.... Espero que onde quer que estejas, te enchas de orgulho...

À minha Lyra, por me fazer amar cada vez mais os animais, e principalmente os cães... Por me fazer lutar para saber sempre mais, por me acompanhar em todos os momentos do meu

dia, de dias de estudo intenso, por me aquecer nos dias frios... Por ser o animal que mais me marcou até hoje... Obrigada por seres a melhor cadela do mundo e por me amares tanto como eu a ti!

A ti Lupinho, por teres partido sem eu ter tido a oportunidade de te ajudar... Perdoa-me...

Ao Gandhi, ao Kada e à Angel, por serem os cães mais queridos para os que os rodeiam! Por me fazerem querer saber sempre mais para vos poder ajudar para sempre!

A toda a minha família, por me apoiarem e compreenderem o melhor possível todas as vezes que estive ausente por trabalho...

Obrigada a todos os animais e respetivos donos que cruzaram o meu caminho... Obrigada a todos os donos que desde o primeiro momento até ao último momento, fosse ele bom ou mau, nunca desistiram dos seus animais e sempre deram tudo o que tinham e o que não tinham para os ajudar... Obrigada por me fazerem ver que o amor que sentem pelos vossos animais é mais forte que tudo e que às vezes um simples carinho é o mais importante... Ao Obama, um gatinho muito querido com uns donos extraordinários e que me marcou muito... À Piggy, uma Cocker doce com uns donos que amavam muito, que a acarinhavam no interior da jaula e que fizeram tudo para que ela estivesse o mais confortável possível...

Obrigada a todas as pessoas que cruzaram o meu caminho durante este ano de estágio e realização da tese, porque nada acontece por acaso e porque todas as pessoas que se cruzam connosco nos transmitem algum ensinamento, mesmo que este seja negativo... mas sobretudo aos positivos!

RESUMO

DETEÇÃO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP., EM GATOS DA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (IFI E ELISA) E DE UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR) APLICADA A CÉLULAS CONJUNTIVAS E A SANGUE.

A leishmaniose visceral zoonótica é uma doença endémica em Portugal e é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. O cão é o principal hospedeiro reservatório natural, contudo o gato (*Felis catus domesticus*) tem revelado uma importância crescente na epidemiologia da doença.

Nesta dissertação foi realizado um rastreio epidemiológico da infeção por *Leishmania* spp. em 47 animais, 32 deles com dono e 15 provenientes de um gatil, na Área Metropolitana de Lisboa (AML), utilizando duas técnicas serológicas, para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Imunoflorescência Indireta (IFI) -, ambas com limiar de positividade de 1:80, e uma técnica molecular para deteção de ADN do parasita - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), utilizando sangue, colhido por venipuntura, e células conjuntivas (CC), obtidas por zaragatoa conjuntival, como amostras biológicas. Foram ainda avaliados possíveis fatores de risco através da recolha de informação proveniente de um questionário por animal.

Por ambos os métodos serológicos, nenhum animal apresentou anticorpos anti-*Leishmania*, pelo que não foi possível determinar qual a técnica mais adequada para detetar o protozoário nos gatos. Pela técnica de qPCR, 31,9% (15/47) das amostras de CC e 25,0% (8/32) das de sangue evidenciaram ADN de *Leishmania* spp. (com carga parasitária entre 140 e 1187 cópias da sequência alvo nas amostras de CC e entre 880 e 3186 cópias da sequência alvo no sangue).

Através da análise estatística, concluiu-se que não existiu, neste estudo, nenhuma associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os vários fatores de risco e os resultados das técnicas utilizadas.

Os médicos veterinários e proprietários devem ser alertados para o crescente número de casos da infeção por *L. infantum* e de leishmaniose felina em Portugal, devendo esta parasitose fazer parte do painel de diagnósticos diferenciais no gato.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, gato, Área Metropolitana de Lisboa, ELISA, IFI, qPCR, células conjuntivas, sangue.

ABSTRACT

DETECTION OF *LEISHMANIA* SPP. INFECTION, IN CATS OF LISBON METROPOLITAN AREA, BY SEROLOGIC TECHNIQUES (IFAT AND ELISA) AND A MOLECULAR TECHNIQUE (qPCR) APPLIED TO CONJUNCTIVAL CELLS AND BLOOD SAMPLES.

Zoonotic visceral leishmaniosis is an endemic disease in Portugal caused by *Leishmania infantum*. Dog is the main natural reservoir host, however cat (*Felis catus domesticus*) has shown an increasing importance in the disease's epidemiology.

In this study, an epidemiological survey of *Leishmania* spp. infection was carried out in 47 animals, 32 with owners and 15 from a shelter, in Lisbon Metropolitan Area, using two serological - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) – with a 1:80 cut-off for detection of anti-*Leishmania* antibodies, and a molecular technique – Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) - for detection of *Leishmania* DNA in blood samples collected by venipuncture and conjunctival cells (CC) samples collected by conjunctival swab.

A written questionnaire was used to collect data in order to evaluate the possible risk factors for *Leishmania* spp. infection in cats.

All the serum samples were negative by both serological methods. By qPCR, 31,9% (15/47) of the CC samples and 25,0% (8/32) of blood samples showed *Leishmania* spp. DNA (parasitic load varied between 140 and 1187 copies of the target sequence in the CC samples and between 880 and 3186 copies in blood samples).

In the present work, there was not statistically significant association ($p < 0.05$) between risk factors and diagnostic results.

Veterinarians and owners should be aware of the growing number of cases of *L. infantum* infection and feline leishmaniosis in Portugal, in order to consider this parasitic disease in the cat differential diagnosis panel.

Keywords: *Leishmania infantum*, cat, Lisbon Metropolitan Area, ELISA, IFAT, qPCR, conjunctival cells, blood.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	1
1. Introdução	1
2. VetOeiras – HVCLC.....	1
2.1 Área Clínica.....	1
2.2 Área Cirúrgica	3
2.3 Exames Complementares de Diagnóstico	3
3. Atividades desenvolvidas na FMV/ULisboa no âmbito da componente laboratorial da presente dissertação de mestrado	4
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Introdução sobre infecção por <i>Leishmania</i> spp. e leishmanioses.....	5
2. Etiologia.....	6
2.1 Zimodemos.....	7
3. Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	8
3.1 Desenvolvimento no Hospedeiro Vertebrado	8
3.2 Desenvolvimento no Hospedeiro Invertebrado / Vetor.....	10
4. Hospedeiros	11
4.1 Hospedeiros Vertebrados	11
4.2 Hospedeiros Invertebrados / Vetores	12
5. Vias de transmissão	15
6. Epidemiologia.....	15
6.1 Epidemiologia da infecção por <i>Leishmania</i> spp. no gato e da leishmaniose felina.....	17
7. Patogenia e Resposta Imunitária.....	19
8. Diagnóstico	23
8.1 Diagnóstico Clínico.....	23
8.2 Diagnóstico Laboratorial	25
8.2.1 Diagnóstico Direto ou Parasitológico	26
8.2.1.1 Exame citológico	26
8.2.1.2 Exame histopatológico	27
8.2.1.3 Imunocitoquímica (ICQ) e imunohistoquímica (IHQ)	28
8.2.1.4 Cultura <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	28
8.2.1.5 Xenodiagnóstico	29
8.2.1.6 Técnicas moleculares – PCR	29

8.2.2 Diagnóstico Indireto	33
8.2.2.1 Diagnóstico Serológico	33
8.2.2.1.1 Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)	35
8.2.2.1.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	36
8.2.2.1.3 Teste de Aglutinação Direta (TAD)	38
8.2.2.1.4 <i>Western Blot</i> (WB)	38
8.2.3 Técnicas laboratoriais complementares de diagnóstico	38
9. Tratamento e Prognóstico.....	39
10. Prevenção e Profilaxia.....	41
11. Importância em Saúde Pública.....	43
CAPÍTULO III – DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> SPP., EM GATOS DA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (IFI E ELISA) E DE UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR) APLICADA A CÉLULAS CONJUNTIVAS E A SANGUE.	45
1. Objetivos	45
2. Material e Métodos.....	45
2.1 Caracterização da área geográfica em que o estudo foi realizado	45
2.2 Caracterização da época de recolha de amostras	47
2.3 Caracterização geral da população de gatos em estudo	47
2.3.1 Recolha de informação individual	47
2.4 Colheita e conservação de amostras biológicas	48
2.5 Técnicas de diagnóstico e respetivos protocolos utilizados.....	49
2.5.1 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> pela técnica de ELISA.....	49
2.5.2 Pesquisa de anticorpos anti- <i>L. infantum</i> pela técnica de IFI.....	50
2.5.3 Detecção de ADN de <i>Leishmania</i> spp. através da técnica de qPCR.....	50
2.5.3.1 Método de extração de ADN	51
2.5.3.2 Técnica de qPCR.....	51
2.6 Análise estatística	54
3. Resultados	55
3.1 Caracterização dos animais da amostra	55
3.1.1 Concelho	55
3.1.2 Época de maior atividade vetorial.....	55
3.1.3 Sexo.....	56
3.1.4 Idade.....	56
3.1.5 Raça.....	57

3.1.6 Tipo de pelagem	57
3.1.7 Origem.....	58
3.1.8 Habitat	58
3.1.9 Coabitação com outros animais.....	59
3.1.10 Profilaxia contra ectoparasitas.....	60
3.1.11 Presença de doenças	60
3.1.11.1 Presença de retrovíroses (FIV e/ou FeLV)	60
3.1.12 Presença de sinais clínicos compatíveis com LFel.....	61
3.2 Resultados obtidos pela técnica de ELISA na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp.....	61
3.3 Resultados obtidos pela técnica de IFI na pesquisa de anticorpos anti- <i>L. infantum</i> ...	61
3.4 Resultados obtidos pela técnica de qPCR, em CC e em sangue, na pesquisa de ADN de <i>Leishmania</i> spp.....	61
3.5 Resultados da análise estatística.....	63
4. Discussão	65
IV – CONCLUSÃO	82
V - BIBLIOGRAFIA.....	83
VI – ANEXOS.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação das formas amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i> spp.	7
Figura 2. Resumo do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. no hospedeiro vertebrado	9
Figura 3. Esquema ilustrativo do ciclo de vida do subgénero <i>Leishmania</i> no hospedeiro invertebrado	10
Figura 4. Morfologia de flebótomos <i>P. perniciosus</i> macho e fêmea	13
Figura 5. Número de casos clínicos de LFel reportados na Europa (1977 - 2014).....	17
Figura 6. Lesões cutâneas em gatos naturalmente infetados por <i>L. infantum</i> e <i>L. chagasi</i>	24
Figura 7. Uveíte aguda com coágulo de fibrina num gato FIV positivo com LFel	25
Figura 8. IHQ de uma biópsia de nódulo cutâneo de um gato, evidenciando <i>Leishmania</i> spp. no interior de macrófagos (coloração HE).....	28
Figura 9. Mapa da AML com marcação dos 18 concelhos que a constituem.....	46
Figura 10. Exemplificação da recolha de células conjuntivais ao nível da pálpebra inferior..	48
Figura 11. Constituição do kit LEISCAN [®] <i>Leishmania</i> ELISA Test	49
Figura 12. Aspeto de amostras positiva e negativa para <i>L. infantum</i> pela técnica de IFI, na diluição 1:80	50
Figura 13. Exemplificação das curvas de amplificação nas diluições seriadas do plasmídeo recombinante e respetivos valores de Ct, obtido por qPCR	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das consultas por especialidade	2
Tabela 2. Distribuição das cirurgias assistidas em cada especialidade cirúrgica.	3
Tabela 3. Sinais clínicos mais e menos frequentemente reportados.....	25
Tabela 4. Alterações encontradas nas técnicas laboratoriais complementares de diagnóstico de LFel	39
Tabela 5. Resumo de substâncias ativas já utilizadas no tratamento de LFel	40
Tabela 6. Resumo dos protocolos terapêuticos realizados em 19 casos clínicos de LFel	41
Tabela 7. Fases da amplificação da técnica de qPCR.....	52
Tabela 8. Diluições seriadas do plasmídeo recombinante e os respectivos valores médios de Ct.	53
Tabela 9. Frequências absolutas e relativas da coabitação dos gatos da amostra com outros animais	59
Tabela 10. Distribuição dos gatos por presença de doença	60
Tabela 11. Distribuição dos resultados positivos obtidos pela técnica de qPCR nas duas amostras biológicas.	61
Tabela 12. Resultados das amostras analisadas por todas as técnicas utilizadas (IFI, ELISA, qPCR em CC e qPCR em sangue).	62
Tabela 12 (continuação). Resultados das amostras analisadas por todas as técnicas utilizadas (IFI, ELISA, qPCR em CC e qPCR em sangue).	63
Tabela 13. Avaliação da associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos compatíveis com LFel com a infecção por <i>Leishmania</i> spp., segundo os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC e sangue	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição dos animais presentes à consulta por espécie.....	2
Gráfico 2. Média das temperaturas máxima e mínima mensais registadas na cidade de Lisboa de Outubro de 2013 a Julho de 2014	46
Gráfico 3. Reta padrão obtida pelas diluições seriadas do plasmídeo recombinante	54
Gráfico 4. Distribuição dos gatos por concelho	55
Gráfico 5. Distribuição dos gatos por época de recolha das amostras.....	56
Gráfico 6. Distribuição dos gatos por sexo	56
Gráfico 7. Distribuição dos gatos por classes etárias.....	57
Gráfico 8. Distribuição dos gatos por raça.....	57
Gráfico 9. Distribuição dos gatos por tipo de pelagem.....	58
Gráfico 10. Distribuição dos gatos de acordo com a sua origem.....	58
Gráfico 11. Distribuição dos gatos por tipo de habitat	59
Gráfico 12. Distribuição dos gatos por coabitação com cães clinicamente saudáveis ou infetados por <i>L. infantum</i>	59
Gráfico 13. Distribuição dos gatos por realização de profilaxia contra ectoparasitas	60
Gráfico 14. Exemplo da amplificação de duas amostras positivas para <i>Leishmania</i> spp., do controlo positivo e ausência de amplificação de outras amostras pela técnica de qPCR.	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I - Seroprevalências obtidas em estudos epidemiológicos na Europa (2000 – 2013).	105
Anexo II - Prevalências obtidas em estudos epidemiológicos, através da técnica de PCR, na Europa (2000 - 2013)	106
Anexo III - Lista de posologias, a sua eficácia e efeitos secundários reportados em gatos com LFel	107
Anexo IV - Principais espécies de <i>Leishmania</i> , tipo de doença causada no Homem e a sua distribuição geográfica	111
Anexo V - Inquérito realizado aos proprietários dos felinos domésticos assistidos no Hospital Veterinário VetOeiras	112
Anexo VI - Inquérito realizado no Gatil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira.	115
Anexo VII - Procedimento do ensaio do kit LEISCAN® <i>Leishmania</i> ELISA Test.	118
Anexo VIII - Protocolo da técnica de IFI (kit <i>Leishmania</i> Spot IFI®, Laboratório BioMérieux) adaptado.	119
Anexo IX - Protocolo de extração de ADN do kit DNeasy Blood & Tissue Kit® (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha) adaptado.	121
Anexo X - Resultados da técnica de ELISA sob a forma de razão da amostra (Rz), de acordo com a fórmula e tabela fornecidas pelo fabricante do kit LEISCAN® <i>Leishmania</i> ELISA Test.	122
Anexo XI - Resultados da técnica de qPCR em CC, com o respetivo Ct médio, número de cópias por µL, número de cópias e número de parasitas na amostra biológica.	123
Anexo XII - Resultados da técnica de qPCR em sangue, com o respetivo Ct médio, número de cópias por µL e número de cópias na amostra e número de parasitas por mL de amostra biológica.	125
Anexo XIII - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC.	127
Anexo XIII (continuação) - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC	128
Anexo XIV - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais compatíveis com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em sangue.	129
Anexo XV - Caracterização dos animais com resultados positivos pela técnica de qPCR em, pelo menos, uma das amostras biológicas utilizadas (CC e sangue).	131

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

° - graus

°C - graus Celsius

= - igual

≈ - aproximadamente

≥ - maior ou igual

< - menor

> - maior

% - percentagem

μL - microlitro

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ALT – Alanina Aminotransferase

AML – Área Metropolitana de Lisboa

APC – Células Apresentadoras de Antígenos (*Antigen Presenting Cells*)

ARN – Ácido Ribonucleico

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP - Adenosina Trifosfato

BID – duas vezes ao dia

CC – Células Conjuntivais

CD - glicoproteína de superfície de linfócitos e outras células imunitárias (*Cluster of Differentiation*)

Ct – *Cycle Threshold*

D.O. – Densidade Ótica

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

E - Eficiência de reação

EC – Europeu Comum

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EUA – Estados Unidos da América

FA – Fosfatase Alcalina

FA – Frequência Absoluta

FAM – 6-carboxifluoresceína

Fc – fragmento cristalizável do anticorpo

FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia

FeLV – Vírus da Leucemia Felina (*Feline Leukemia Virus*)
 FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina (*Feline Immunodeficiency Virus*)
 FMV/ULisboa - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
 FR – Frequência Relativa
 GP63 – Glicoproteína 63
 GTP - Guanosina Trifosfato
 h - horas
 HE – Hematoxilina-Eosina
 HVCLC - Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais
 IC – Intervalo de Confiança
 ICQ – Imunocitoquímica
 IFAT – Immunofluorescence Antibody Test
 IFI - Imunofluorescência Indireta
 IFN- γ – Interferão gama
 IFRA - Instituto de Fisioterapia e Reabilitação Animal
 Ig – Imunoglobulina
 IHQ - Imunohistoquímica
 IL – Interleucina
 IM – via intramuscular
 iNOS – Óxido Nítrico Sintetase induzível (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)
 IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera
 IR – Insuficiência Renal
 IRA – Insuficiência Renal Aguda
 IRC – Insuficiência Renal Crónica
 IV – via endovenosa
 k – coeficiente *Kappa* de Cohen
 kADN – ADN do cinetoplasto (*kinetoplast*)
 kg - kilograma
 km – quilómetro
 L - litro
 LC – Leishmaniose Cutânea
 LCan – Leishmaniose Canina
 LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
 LDPK - Leishmaniose Dérmica Pós -*Kala-Azar*
 LFel – Leishmaniose Felina

LHum – Leishmaniose Visceral Zoonótica Humana
 LMC – Leishmaniose Mucocutânea
 Log – logaritmo
 LPA - ensaio de proliferação de linfócitos (*Lymphocyte Proliferation Assay*)
 LPG - Lipofosfoglicano
 LV – Leishmaniose Visceral
 LVZ – Leishmaniose Visceral Zoonótica
 mg - miligrama
 MHC-II - Complexo Maior de Histocompatibilidade tipo II (*Major Histocompatibility Complex class II*)
 m - metro
 min. - minuto
 mL – mililitro
 mm - milímetro
 MO – Medula Óssea
 MON – Montpellier
 n° - número
 N – Norte
 NaCl – Cloreto de Sódio
 NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
 ng – nanogramas
 nm – nanômetros
 nM - nanomoles
 NO – Óxido Nítrico
 nPCR – *nested* PCR
 NM – Novo Mundo
 O₂ – Oxigênio
 OIE - Organização Mundial de Saúde Animal
 OMS – Organização Mundial de Saúde
p – nível de significância
 PAAF – Punção Aspirativa de Agulha Fina
 pb – pares de bases
 PBS - Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)
 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
 PD – Polidipsia

PIF – Peritonite Infeciosa Felina

PO – via oral (*per os*)

PSG – Gel Secretor de Promastigotas (*Promastigote Secretor Gel*)

PU – Poliúria

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real-Time Polimerase Chain Reaction* ou *Quantitative Polimerase Chain Reaction*)

QUOD – dia sim dia não

R^2 – Coeficiente de determinação

rARN - Ácido Ribonucleico ribossômico

RFLP - Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

rpm – rotações por minuto

Rz – Razão da amostra

S – Sul

SC – via subcutânea

SID – uma vez ao dia

sp. – espécie

spp. - espécies

TAD – Teste de Aglutinação Direta

TAMRA - Tetrametilrodaminana

Th – Linfócito T auxiliar (*T helper cell*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alfa*)

UI – Unidades Internacionais

WB – *Western Blot*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VM – Velho Mundo

ZC – Zaragatoa conjuntival

CAPÍTULO I – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. Introdução

O estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária foi realizado no VetOeiras – Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais (HVCLC). Teve início no dia 15 de Setembro de 2013 e terminou no dia 15 de Março de 2014, sob orientação do Dr. Luís Miguel Caeiro Chambel e com a coorientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV/ULisboa).

A escolha do tema desta dissertação de mestrado prende-se com o interesse da autora por esta zoonose, devido à sua extrema importância na Saúde Animal e na Saúde Pública, realçando o papel do Médico Veterinário em ambas as áreas.

2. VetOeiras – HVCLC

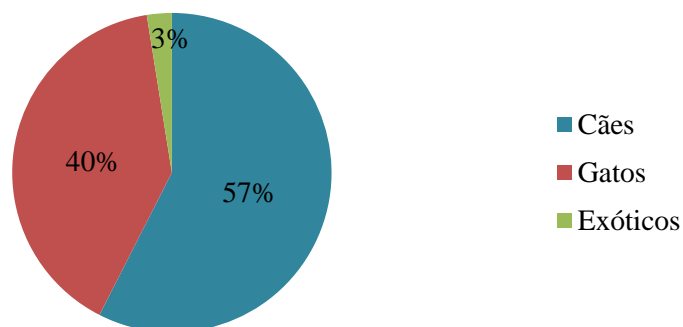
O VetOeiras é um hospital médico-veterinário localizado no concelho de Oeiras, na Estrada de Oeiras, pertencente à Área Metropolitana de Lisboa (AML), e é dirigido pelo Dr. Luís Chambel e pelo Dr. Rui Ferreira de Almeida, contando com a colaboração de mais seis médicos veterinários fixos, três médicos veterinários que realizam consultas de referência em oftalmologia, ecografia geral e ecocardiografia, três enfermeiros veterinários, duas auxiliares de veterinária e uma auxiliar de limpeza.

O hospital encontra-se aberto 24 horas, todos os dias do ano. O horário realizado pelos estagiários obedeceu a um plano de rotatividade semanal entre os turnos: 9h às 17h, 12h às 20h e 16h às 24h, e os fins-de-semana e feriados também rotativos, das 9h às 24h.

2.1 Área Clínica

Durante as consultas, foi possível acompanhar ou realizar sob supervisão: anamnese, exame físico, contenção, colheita de material biológico (sangue, urina ou zaragatoas auriculares), análises clínicas (hemograma, perfil bioquímico, urianálise, citologia e vários testes rápidos de diagnóstico) e a administração de fármacos. Para além dos animais de companhia mais comuns (cão e gato), a autora acompanhou também animais exóticos (pequenos mamíferos, aves e répteis) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição dos animais presentes à consulta por animal (n=1548).



As consultas de cães e gatos foram distribuídas por especialidade (50%), tratamentos/pós-operatório (20%) e medicina preventiva (30%) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das consultas por especialidade (n=774).

	FA	≈FR (%)		FA	≈FR (%)
Gastroenterologia	135	17	Oncologia	40	5
Ortopedia	132	17	Infecciologia	38	5
Oftalmologia	76	10	Pneumologia	26	3
Nefrologia/Urologia	75	10	Ginecologia/Andrologia	10	1
Dermatologia	74	10	Endocrinologia	7	1
Otorrinolaringologia	56	7	Neurologia	6	1
Cardiologia	48	6	Reprodução e Obstetrícia	5	1
Estomatologia	44	6	Comportamento	2	0,3

Legenda: FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa aproximada.

As consultas de tratamentos/pós-operatórios incluem: observação dos pacientes após cirurgia (mudança de pensos e desinfecção, limpeza e remoção de suturas) e tratamentos simples, como fluidoterapia subcutânea e administração de injetáveis. As consultas de medicina preventiva incluem: vacinações, desparasitações, colocação de aparelhos de identificação eletrônica e conselhos de nutrição.

No internamento foram adquiridos conhecimentos e competências práticas extremamente importantes para a prática clínica futura, algumas delas básicas mas com grande influência no bem-estar dos animais: limpeza, alimentação, contenção, exame físico completo e monitorização de todos os animais internados, administração de fármacos pelas diferentes vias (*per os* (PO), subcutânea (SC), intramuscular (IM) e endovenosa (IV)), colheita de sangue, colocação de cateteres endovenosos, medição de pressão arterial, oxigenoterapia, execução de drenagens de derrames (torácicos e abdominais), transfusão sanguínea, medição de glicemia, realização de pensos e algaliações.

Cerca de 3 meses após o início do estágio, o VetOeiras abriu um novo espaço, Instituto de Fisioterapia e Reabilitação Animal (IFRA), onde apenas se realizam sessões de fisioterapia e no qual a autora teve a oportunidade de auxiliar em todo o tipo de procedimentos, desde a realização de ultrassons, electroterapia e hidroterapia.

2.2 Área Cirúrgica

Nesta área, a autora teve a possibilidade de realizar a preparação pré-cirúrgica dos animais (preparação e administração da pré-medicação e anestesia, entubação endotraqueal, tricotomia, lavagem e desinfecção do animal). No período intracirúrgico, realizou funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante. No período pós-operatório, acompanhou os animais desde a saída da sala de cirurgia até à sua recuperação no internamento. Foram realizadas 240 cirurgias no período de estágio referido (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das cirurgias assistidas em cada especialidade cirúrgica (n=240).

	FA	≈FR (%)
Aparelho reprodutor	94	39
Ortopedia	63	26
Gastroenterologia	26	11
Oftalmologia	17	7
Estomatologia	15	6
Pele e anexos	8	3
Laparotomia exploratória	6	3
Outros	6	3
Aparelho Urinário	3	1
Esplenectomia	2	1

Legenda: FA: frequência absoluta; ≈FR: frequência relativa aproximada.

Na categoria “Outros” estão incluídos métodos de diagnóstico nos quais é necessária anestesia geral do animal, nomeadamente, artroscopia, endoscopia e lavagens traqueobrônquica e broncoalveolar.

2.3 Exames Complementares de Diagnóstico

Relativamente à Imagiologia, foram alargados os conhecimentos, sobretudo, nas áreas de radiologia, ecografia e endoscopia.

Em radiologia, foi possível realizar radiografias de tecidos moles (torácicas e abdominais) e de tecido ósseo (esqueleto axial e apendicular), melhorando os conhecimentos acerca do posicionamento correto do animal, da utilidade deste meio de diagnóstico e da interpretação de imagens radiográficas. Na ecografia, enquanto realizava a contenção dos animais, foram

observados vários exames ecográficos, nomeadamente abdominais e cardiológicos, incluindo alguns procedimentos ecoguiados: punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de estruturas internas, cistocentese, toracocentese e abdominocentese. Foi ainda possível praticar a técnica ecográfica em alguns animais. Durante os exames ecocardiográficos e electrocardiográficos foi também possível a visualização e análise de electrocardiogramas simples. Ao nível da endoscopia, foi possível assistir e auxiliar várias artroscopias e broncoscopias, e, ainda, uma rinoscopia.

No hospital VetOeiras, a autora teve a oportunidade de realizar diversas análises laboratoriais, entre elas, hemograma, bioquímicas sanguíneas, ionograma, urianálise, testes rápidos de diagnóstico, microhematócrito, cultura de fungos, exame citológico após coloração de várias amostras. Ao longo do estágio foi ainda possível realizar algumas necrópsias.

O VetOeiras é constituído por uma equipa diversificada, o que possibilitou não só um crescimento em termos pessoais, mas, sobretudo, uma grande aprendizagem teórica e prática em várias áreas essenciais à futura prática clínica em medicina de animais de companhia.

3. Atividades desenvolvidas na FMV/ULisboa no âmbito da componente laboratorial da presente dissertação de mestrado

Foi no laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no laboratório de Virologia da FMV/ULisboa que se realizou o processamento das amostras e as técnicas de diagnóstico para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*: Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Imunofluorescência Indirecta (IFI), e para a pesquisa de ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita através da Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Para a realização das técnicas serológicas, a autora contou com a preciosa colaboração da Dra. Lídia Gomes e, ainda, com a prévia explicação acerca do teste ELISA (kit LEISCAN[®] *Leishmania* ELISA Test) por parte da Dra. Andreia Oliveira (Esteve) e da coordenadora, Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca. A extração de ADN e a técnica de qPCR foi realizada pelo Mestre Marcos Santos, o qual a autora teve oportunidade de acompanhar algumas vezes.

A colheita das amostras biológicas foi realizada pela autora durante e após a conclusão do estágio curricular e teve o apoio da equipa do hospital VetOeiras e de colegas estagiários e do Mestre João Alvarez dos Santos, Médico Veterinário Municipal de Vila Franca de Xira, em animais pertencentes ao Gatil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução sobre infecção por *Leishmania* spp. e leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias que podem comprometer pele, mucosas e vísceras, dependendo da espécie do parasita e da resposta imunitária do hospedeiro, e que pode ocorrer no Homem e outros animais (Ashford, 2000; Bates, 2007; De Arruda, 2010).

No Homem, são endémicas em mais de 98 países ou territórios em todo o mundo (Organização Mundial de Saúde [OMS], 2014c), ocorrendo desde as zonas intertropicais do continente americano e africano até às regiões temperadas da América Latina, Europa e Ásia (Gramiccia, 2011), excluindo apenas a Austrália e a Antártica (Hide *et al.*, 2007).

O parasita responsável por estas doenças é um protozoário do género *Leishmania* (L.), que é transmitido por vetores artrópodes do género *Phlebotomus* no Velho Mundo (VM) (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (NM) (Américas) (Gramiccia, 2011).

Nos animais, existem três formas da doença: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Sundar & Rai, 2002). O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal hospedeiro reservatório doméstico/peridoméstico da LV zoonótica (LVZ), doença endémica na bacia do Mediterrâneo e Portugal, África, sul da Ásia e Médio Oriente, onde o agente etiológico é *L. infantum*, e na América do Sul e Central é *L. chagasi* (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Existem duas formas de LV em termos epidemiológicos e clínicos: zoonótica, a maioria, que afeta sobretudo crianças e indivíduos imunocomprometidos e o cão, ou antroponótica, uma pequena percentagem, na qual a transmissão ocorre diretamente, através do vetor, entre pessoas de todas as idades (Gramiccia, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012a). A LV é causada por *L. donovani* e *L. infantum* no VM e por *L. chagasi* no NM (Gramiccia, 2011). Na Europa, o agente da LC e LV é *L. infantum* (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008; Tomás & Romão, 2008).

Apesar de vários países terem implementado diversas medidas para a diminuição da doença e da sua transmissão, a sua prevalência nunca sofreu grandes alterações. Para além do facto de existir uma grande percentagem de cães infetados seronegativos e assintomáticos, outra hipótese foi sugerida: a existência de outros hospedeiros reservatórios responsáveis pela manutenção do parasita no habitat doméstico e peridoméstico (Maia & Campino, 2011b). Por este motivo e pelo crescente número de casos em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*),

foi sugerido que esta espécie poderá ter um papel significativo no ciclo de vida do parasita (Maia & Campino, 2011b).

2. Etiologia

O agente etiológico desta doença pertence à Filo Sarcomastigophora, Classe Kinetoplastea, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Género *Leishmania* (Ross, 1903) (Moreno, Nieto & Rodríguez, 2002; Baneth & Solano-Gallego, 2012a).

Este género divide-se nos seguintes subgéneros, responsáveis pelas leishmanioses nos mamíferos e no Homem: *Leishmania* (L.) no VM e NM e *Viannia* (V.) no NM, e cuja diferença reside no órgão onde se desenvolvem no vetor. Existe ainda o subgénero *Sauroleishmania* no VM, responsável pelas leishmanioses em lacertídeos (Bates, 2007). Nesta monografia apenas se abordará o subgénero *Leishmania*.

Os principais complexos e espécies pertencentes ao subgénero *Leishmania* são: complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*), complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e pelas espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* (Hubálek & Rudolf, 2011). Estudos genéticos permitiram concluir que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* correspondem ao mesmo protozoário, permanecendo ambas as designações como sinónimos, no VM e NM (Maurício, Stothard & Miles, 2000 citado por Gomes, Cavalcanti, Lira, Abath & Alves, 2008).

As espécies mais importantes associadas aos animais são *L. infantum* (VM) e *L. chagasi* (NM) (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No ciclo antroponótico, as principais espécies são *L. tropica* e *L. donovani* (Ready, 2010).

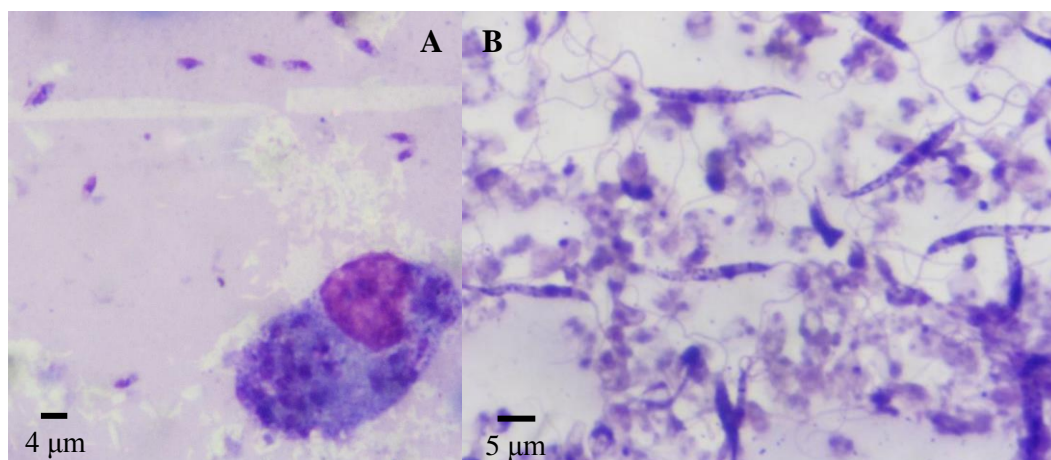
As espécies encontradas nos gatos domésticos até hoje foram: *L. infantum* (Europa e Irão), *L. chagasi* (Brasil), *L. venezuelensis* (Venezuela), *L. mexicana* (Texas e Estados Unidos da América (EUA)), *L. (V.) braziliensis* (Brasil e Guiana Francesa) e *L. amazonensis* (Brasil), sendo as 3 últimas espécies responsáveis, sobretudo, por sinais dermatológicos (Pennisi *et al.*, 2013). Até ao presente, na Europa, a única espécie isolada em gatos foi *L. infantum* (Pennisi, 2014).

O ciclo de vida destes protozoários é heteroxeno, ou seja, parte do seu desenvolvimento ocorre num hospedeiro invertebrado antes de parasitar o hospedeiro vertebrado. Durante o seu ciclo passam por alterações morfológicas, sendo designados de dimórficos por apresentarem duas formas diferentes: amastigota e promastigota (Tomás & Romão, 2008).

A forma amastigota é a que se encontra no hospedeiro vertebrado e pode ser encontrada, intracelular, em células do sistema mononuclear fagocitário: macrófagos (sobretudo), monócitos, células de Langerhans e células de Kupffer. Possui uma forma redonda a oval, com cerca de 4 x 2 µm, um citoplasma com um só núcleo basófilo, um cinetoplasto (estrutura onde se encontra o ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, denominando-se, habitualmente, de ADN do cinetoplasto (kADN)), em forma de bastonete e situado na base do flagelo, e um flagelo rudimentar sem mobilidade (Figura 1) (Roze, 2005; Tomás & Romão, 2008; Gramiccia, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012a).

A forma promastigota é a forma infetante do hospedeiro vertebrado, extracelular e que se encontra no aparelho digestivo do vetor. É fusiforme, com cerca de 15 x 3 µm, e possui um só núcleo central, um cinetoplasto terminal e um flagelo livre na região anterior, que pode atingir 20 µm de comprimento e lhe confere motilidade (Figura 1) (Tomás & Romão, 2008; Gramiccia, 2011; Cardoso & Solano-Gallego, 2013). Ambas as formas reproduzem-se assexualmente por divisão binária longitudinal (Baneth & Solano-Gallego, 2012a).

Figura 1. Representação das formas amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania* spp. (Original).



Legenda: A - formas amastigotas de *Leishmania* spp. extracelulares e intracelulares num macrófago canino, obtidas por esfregaço de medula óssea (coloração Giemsa); B - formas promastigotas de *Leishmania* spp. em meio de cultura (coloração Giemsa).

2.1 Zimodemos

Atualmente, o *gold standard* para a identificação das diferentes espécies de *Leishmania* consiste na caracterização isoenzimática através de electroforese enzimática multilocular, permitindo a identificação de zimodemos, ou seja, de grupos de parasitas com um mesmo perfil de migração isoenzimática (Noli, Lloyd, Loeffler, Schwendenwein & Meredith, 2006; Ait-Oudhia, Harrat, Benikhlef, Dedet & Pratlong, 2011). No entanto, outros métodos têm sido

utilizados em vez desta: *Polimerase Chain Reaction*/ Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Restriciton Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) (Cortes *et al.*, 2006).

Nos países do Mediterrâneo, *L. infantum* zimodemo MON-1 é o principal agente etiológico de Leishmaniose Canina (LCan) e Leishmaniose Visceral Zoonótica Humana (LHum) (Cardoso & Solano-Gallego, 2013). Desde 1980, na Europa, foram reportados vários casos de infecção por *L. infantum* e alguns casos clínicos de Leishmaniose Felina (LFel) em gatos domésticos, sendo a grande maioria pertencente ao zimodemo MON-1 (Pennisi, 2014). Também foram encontrados zimodemos humanos menos comuns em gatos na Sicília (Itália), MON-72 e MON-201 (Gramiccia *et al.*, 2005).

3. Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.

3.1 Desenvolvimento no Hospedeiro Vertebrado

Os vetores fêmeas alimentam-se no hospedeiro vertebrado, maioritariamente, em zonas glabras, como plano nasal, pavilhão auricular e regiões inguinal e perianal (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

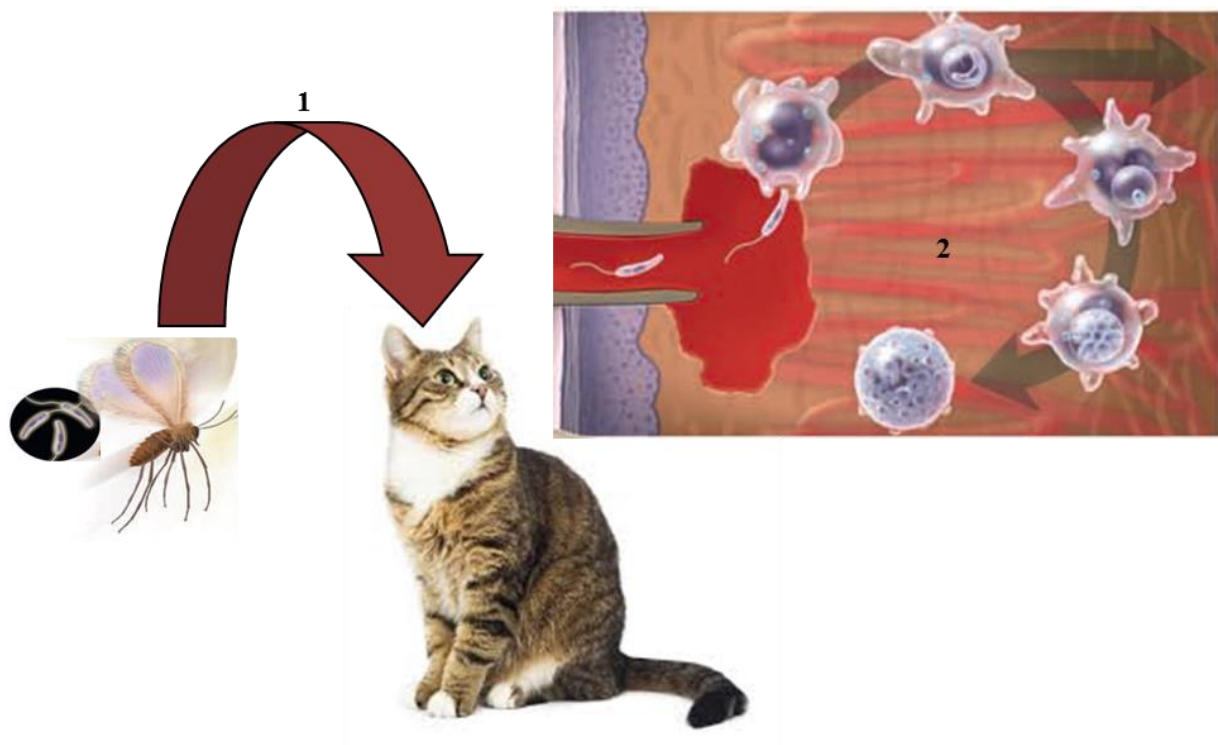
É durante esta refeição que as formas infetantes, promastigotas metacíclicas, são inoculadas no hospedeiro vertebrado ao nível da pele, sendo fagocitadas por células de Langerhans, células dendríticas da derme, neutrófilos e macrófagos, sendo que estes últimos chegam ao local em poucas horas graças à libertação de citocinas quimiotáticas (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Tomás & Romão, 2008).

Após a fagocitose, forma-se um fagossoma, onde ocorre a transformação da forma promastigota em amastigota. No fagossoma fundem-se lisossomas, formando o fagolisossoma, onde há a libertação de hidrolases e metabolitos do oxigénio (como óxido nítrico (NO)), criando um ambiente ácido, hidrolítico e rico em nutrientes. No entanto, os amastigotas conseguem sobreviver neste ambiente, adquirindo facilmente nutrientes e possibilitando a sua multiplicação (Tomás & Romão, 2008).

As formas amastigotas são as responsáveis pela disseminação da infeção nos hospedeiros vertebrados, uma vez que se replicam ativamente no interior dos fagócitos mononucleares, saem para o exterior por lise celular ou exocitose e invadem novos macrófagos e neutrófilos, favorecendo a disseminação da infeção até órgãos linfohematopoiéticos (linfonodos, medula óssea (MO), baço e fígado) (Tomás & Romão, 2008; Saz, Esteve & Solano-Gallego, 2013), para os quais têm um tropismo natural e preferência para a multiplicação (De Almeida Ferreira *et al.*, 2013) (Figura 2).

Após a fagocitose ao nível da pele, os parasitas podem permanecer no local de inoculação ou pode ocorrer disseminação hematogénea e/ou linfática, após um período de tempo indefinido, de amastigotas viáveis ou não (Reithinger, Lambson, Barker & Davies, 2000; Saz *et al.*, 2013). A disseminação linfática é, inicialmente, até ao linfonodo eferente, onde ocorre o processamento e a apresentação antigénica pelos macrófagos e células de Langerhans (células apresentadoras de antígenos (APC)) aos linfócitos T, através das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) (Saz *et al.*, 2013).

Figura 2. Resumo do ciclo de vida de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado (Adaptado de Baneth & Solano-Gallego, 2012a).



Legenda: 1. O flebótomo fêmea infectado, ao realizar a sua refeição sanguínea, regurgita promastigotas metacíclicas na pele. 2. Os promastigotas metacíclicos são fagocitados, transformando-se em amastigotas nos macrófagos e ocorrendo a sua multiplicação nestas células, com a sua lise e infeção de novos macrófagos.

A MO é o órgão alvo predileto para a invasão, multiplicação e reservatório dos parasitas, enquanto o sangue atua como meio de transporte. Verifica-se que a distribuição dos parasitas não é uniforme em todos os órgãos e tecidos, com as mucosas a apresentarem uma fraca colonização e a pele a evidenciar cargas parasitárias idênticas à da MO (Hernández *et al.*, 2015).

3.2 Desenvolvimento no Hospedeiro Invertebrado / Vetor

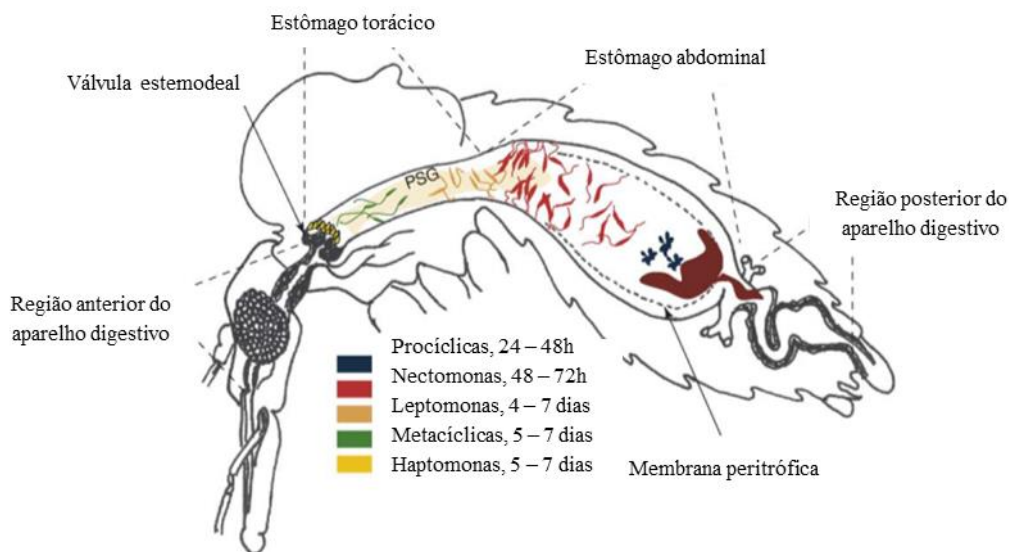
O ciclo de vida de *Leishmania* spp. no hospedeiro invertebrado é de cerca de 6 a 10 dias, dependendo da espécie, e ocorrem 5 formas do parasita: promastigotas procíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclicas (Figura 3) (Afonso & Alves-Pires, 2008).

A infecção do vetor fêmea ocorre quando este realiza uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado com amastigotas de *Leishmania* spp., estando estes presentes sobretudo na pele e não na circulação periférica (Bates, 2007).

O sangue ingerido passa para a região posterior do estômago ou estômago abdominal, no qual é rapidamente envolvido pela membrana peritrófica (tipo I), e entre 1 a 2 dias depois, as formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas (alongadas e grossas com um pequeno flagelo), constituindo a primeira multiplicação intravetorial. Os promastigotas procíclicos estão separados do epitélio gástrico pela membrana peritrófica (rede de proteoglicanos e quitina produzida pelo vetor), que constitui uma proteção face às enzimas digestivas (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os promastigotas procíclicos desenvolvem-se em formas nectomonas (compridas e delgadas) ao fim de 2 – 3 dias, altura em que as quitinases, produzidas quer pelo parasita, quer, provavelmente, também pelo vetor, atingem o pico de atividade, degradando a membrana peritrófica, e possibilitando a migração para a região anterior do estômago ou estômago torácico, onde se ligam às células epiteliais pelo seu flagelo, impedindo a sua eliminação nas fezes (Kamhawi, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008; Oliveira, Jochim, Valenzuela & Kamhawi, 2009).

Figura 3. Esquema ilustrativo do ciclo de vida do subgénero *Leishmania* no hospedeiro invertebrado (Adaptado de Kamhawi, 2006).



Entre 4 – 7 dias, ocorrem as formas leptomonas (curtas) que sofrem a segunda multiplicação intravetorial. Pela mesma altura, surgem já na válvula estemodeal, que separa a região anterior do aparelho digestivo do estômago torácico e que assegura um único sentido para o fluxo de alimentos, duas formas: haptomonas e metacíclicas. As primeiras têm um pequeno flagelo e não se movem, enquanto que as segundas são as formas infetantes, têm um longo flagelo e movem-se rapidamente (Kamhawi, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008; Volf, Hostomska & Rohousova, 2008).

4. Hospedeiros

4.1 Hospedeiros Vertebrados

Várias espécies de mamíferos podem ser naturalmente infetadas por *Leishmania* spp., desde mamíferos domésticos a selvagens, incluindo carnívoros, roedores, marsupiais e primatas, passando pelo próprio Homem (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Também répteis e anfíbios podem ser infetados (Bates, 2007).

Na bacia do Mediterrâneo, Portugal, África, sul da Ásia e Médio Oriente e América do Sul e Central, onde é endémica a LCan, o cão doméstico é considerado o principal hospedeiro reservatório doméstico e peridoméstico de *L. infantum/L. chagasi*, agentes da LVZ, com uma prevalência de infeção de 63% - 80% nestas áreas (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Baneth *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Maia & Campino, 2011a; Vides *et al.*, 2011).

Apesar do papel importante do cão, este parasita é, primariamente, mantido na natureza por hospedeiros reservatórios silváticos, sendo os principais: o lobo (*Canis lupus*), o chacal (*Canis aureus*) e as raposas (*Vulpes* spp., *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) (Gramiccia & Gradoni, 2005; Pereira, 2008). No Mediterrâneo, o principal hospedeiro silvático é a raposa (Grevot *et al.*, 2005). Também roedores sinantrópicos, como *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, podem manter a infeção nos ciclos doméstico e silvático (Helhazar, Leitão, Duarte, Tavares & Pereira da Fonseca, 2013).

Outros mamíferos têm também sido encontrados com *Leishmania* spp., nomeadamente outros carnívoros (felídeos, mustelídeos, viverrídeos, ursídeos), didelfimorfos (opossum), roedores (murídeos, histicídeos), primatas, equídeos, bovídeos (cabra, vaca, búfalo), preguiças, tatus, entre outros (Ashford, 1996; Gramiccia & Gradoni, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010; Antoniou, Gramiccia, Molina, Dvorak & Volf, 2013).

Pensa-se que a maioria destes hospedeiros não contribuam para a persistência do parasita a longo-prazo, sendo considerados hospedeiros acidentais, contudo não se deve desprezar a sua

importância, uma vez que têm a capacidade de introduzir ou reintroduzir a infecção em certas áreas (Roze, 2005; Pereira, 2008).

Atualmente, sabe-se que o gato doméstico é susceptível à infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania*, já referidas, tendo sido também esta confirmada experimentalmente. Assim podemos afirmar que esta doença no gato é causada pelas mesmas espécies que infetam o cão e o Homem, logo, é importante conhecer exatamente o seu papel epidemiológico no ciclo de transmissão desta zoonose (Pennisi & Solano-Gallego, 2013b).

O Homem é um hospedeiro acidental na LVZ, enquanto que no ciclo antroponótico é o principal hospedeiro reservatório (Moreno & Alvar, 2002; Roze, 2005).

4.2 Hospedeiros Invertebrados / Vetores

Os vetores naturais de *Leishmania* spp. são insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Esta subfamília possui 6 géneros, mas apenas dois têm importância em medicina humana e veterinária: o género *Phlebotomus* (P.) no VM, que possui 11 subgéneros, sendo o subgénero *Larroussius* o mais importante na transmissão da leishmaniose, e o género *Lutzomyia* (L.) no NM, com 25 subgéneros e complexos (Killick-Kendrick, 1999; Wall & Shearer, 2001; Gramiccia, 2011). Existe ainda o género *Sergentomyia* (S.) no VM responsável pela transmissão de leishmanias do subgénero *Sauroleishmania* (Bates, 2007).

Os flebótomos são os únicos artrópodes que estão adaptados à transmissão natural de *Leishmania* spp. (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Das 900 espécies conhecidas, não mais de 70 são vetoras deste parasita (Ready, 2013) e destas apenas 30 têm importância do ponto de vista de saúde pública (Sharma & Singh, 2008). As espécies vetoras variam consoante a região geográfica e os nichos ecológicos, mas também dependem das espécies de *Leishmania* (Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007).

Os flebótomos têm um corpo estreito, uma cor que varia de quase branca a quase preta e um comprimento entre 2 a 3 mm. Têm o corpo revestido por sedas e, quando em repouso, as suas asas ficam abertas para cima, em forma de V e não cruzadas sobre o abdómen. A forma do abdómen permite distinguir o sexo do flebótomo, uma vez que apenas os machos possuem os últimos segmentos posteriores modificados, apresentando-se em forma de garra e designando-se por genitália (Figura 4) (Afonso & Alves-Pires, 2008).

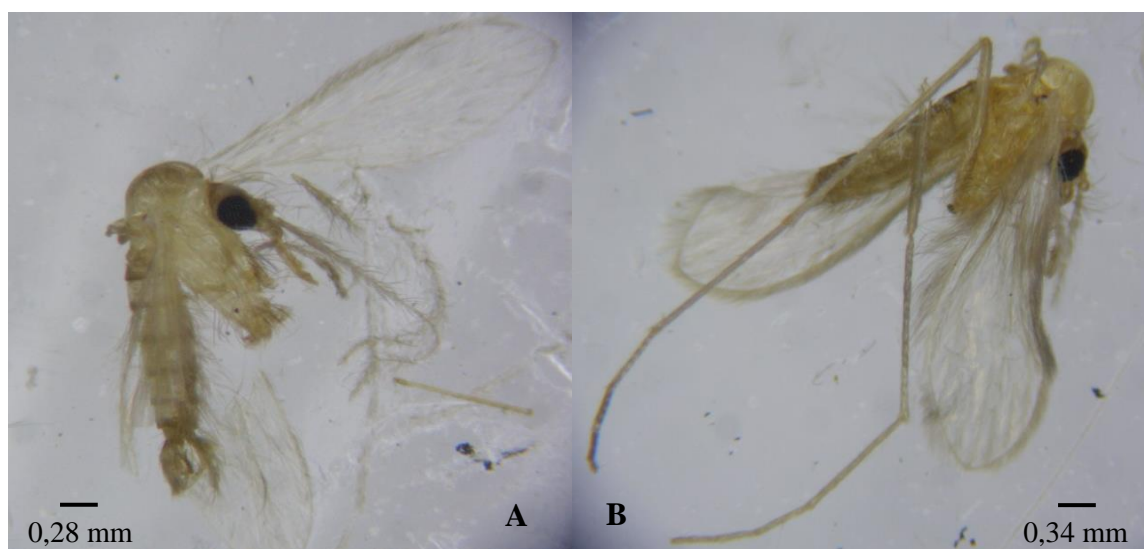
Outras das suas características são rondarem o hospedeiro antes de se fixarem para se alimentar e atacarem silenciosamente (Killick-Kendrick, 1999; Sharma & Singh, 2008).

Fêmeas e machos alimentam-se de fontes naturais de açúcar, como a seiva das plantas, no entanto as fêmeas, e só estas, são também hematófagas, a fim de obterem a proteína

necessária ao desenvolvimento dos seus ovos (Sharma & Singh, 2008). O sangue pode ser proveniente de mamíferos, aves ou répteis (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Ambos os sexos possuem longas peças bucais, mas o aparelho bucal das fêmeas é do tipo picador-sugador e a picada é do tipo telmofágico, ou seja, no momento da refeição faz primeiro um microhematoma, do qual o sangue é depois sugado e ingerido, designando-se de *pool feeding* (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Figura 4. Morfologia de flebótomos *P. perniciosus* macho (A) e fêmea (B) (Gentilmente cedido pelo Mestre David Ramilo).



Enquanto se alimenta, a fêmea saliva para o interior da pele do hospedeiro, a qual possui biomoléculas, com propriedades imunomodadoras e imunogénicas, que facilitam a alimentação da fêmea e a implantação de *Leishmania* spp. (Oliveira *et al.*, 2009).

São fracos voadores e a sua dispersão varia consoante a espécie e os habitats, voando cerca de 300 m, com relatos de que a espécie *P. ariasi* pode alcançar os 2,5 km. Devido a esta fragilidade, encontram-se geralmente perto dos locais de alimentação (Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel & Gradoni, 2013).

Apesar de serem principalmente encontrados em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo, como Europa, Ásia, África, Austrália, Américas Central e do Sul, a sua distribuição varia entre os 50° de latitude N e os 40° de latitude S e a altitudes que vão desde abaixo do nível do mar (Mar Morto) até 3300 metros acima do nível do mar (Afeganistão). Estão ausentes na Nova Zelândia e nas ilhas do Pacífico (Maroli *et al.*, 2013). A distribuição das diferentes espécies de flebótomos pode ou não coincidir com a distribuição de *Leishmania* spp., como é o caso da Austrália, em que apesar de existirem flebótomos, não é conhecido nenhum caso de leishmaniose autóctone (Afonso & Alves-Pires, 2008).

A atividade dos flebótomos é, sobretudo, crepuscular e noturna, entre os 15°C e os 28°C, associado a uma elevada humidade relativa e ausência de vento ou chuva (Afonso & Alves-Pires, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A espécie *L. wellcomei* é uma exceção, estando ativa durante o dia (Sharma & Singh, 2008).

No Mediterrâneo, são principalmente ativos nos meses quentes, desde o fim da primavera ao fim do outono, de Abril a Novembro (Solano-Gallego *et al.*, 2011), e, mais concretamente, em Portugal, de Maio a Outubro, com pico de atividade nos meses de Julho e Agosto (Onleish, 2011). Na América do Sul, alguns flebótomos têm atividade todo o ano, como é o caso de *L. longipalpis*, o principal vetor no NM (Baneth & Solano-Gallego, 2012a).

A transmissão é maioritariamente rural e suburbana, encontrando-se os vetores habitualmente perto de habitações humanas (endofílicos), onde podem entrar à noite devido ao seu fototropismo positivo, ou perto de biótopos com as condições favoráveis ao desenvolvimento das larvas (exofílicos), ou seja, humidade relativa elevada, temperatura moderadas e estáveis, escassa ou nula iluminação e alto teor em matéria orgânica de origem animal ou vegetal (Corrales & Moreno, 2006; Sollano-Gallego *et al.*, 2009).

O ciclo de vida destes pequenos insetos é de cerca de 45 dias, variando com a temperatura, humidade e fotoperíodo, e são holometabólicos, isto é, apresentam metamorfoses completas: ovo, larva (4 fases) e pupa no meio terrestre, e adulto no meio aéreo (Rosypal, Zajac & Lindsay, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008).

No VM, vários são os vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose, mas destacam-se: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. argentipes* e *P. orientalis*. No NM, são considerados como vetores: *L. longipalpis* (o principal) e *L. evansi* (Gomes *et al.*, 2008; Gramiccia, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Em Portugal, são conhecidas quatro espécies de *Phlebotomus* e uma de *Sergentomyia*: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti* e *S. minuta*. (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os principais vetores de *L. infantum* no nosso país e em toda a Europa Ocidental são *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Campino & Maia, 2010), sendo o primeiro o responsável pela maioria das infeções na Península Ibérica (Maia *et al.*, 2010) e a espécie mais abundante na região de Lisboa e no Algarve (Afonso & Alves-Pires, 2008; Maia *et al.*, 2010). *P. ariasi* é, por outro lado, a mais prevalente na região do Alto Douro (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Mundialmente, *P. papatasi* e *P. sergenti* são as espécies conhecidas como sendo vectoras de LC, transmitindo, respetivamente, *L. major* e *L. tropica*, sendo o primeiro vetor pouco frequente no país e o segundo apresenta um maior expressão nas regiões de Évora e na zona oriental do Algarve (Afonso & Alves-Pires, 2008).

5. Vias de transmissão

A transmissão natural de *Leishmania* spp. para os hospedeiros vertebrados ocorre através de insetos fêmeas do género *Phlebotomus* infetados. Não existe, até ao momento, qualquer estudo relativo a outras vias de transmissão nos felinos domésticos, no entanto outras vias estão descritas nos cães (Silva *et al.*, 2009; Boggiato *et al.*, 2011).

As outras vias de transmissão reportadas raramente nos cães são: transmissão por ixodídeos e pulgas, no entanto não existem provas da sua competência vetorial e do seu papel na epidemiologia da doença nos cães (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho & Linardi, 2007); transplacentária (Massucci *et al.*, 2003; Rosypal, Troy, Zajac, Frank & Lindsay, 2005; Silva *et al.*, 2009; Boggiato *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013); venérea (Silva *et al.*, 2009); transmissão direta através de feridas ou mordeduras, que foi proposta como hipótese para justificar a grande prevalência da infeção nos cães da raça Foxhound Americano e a presença de casos autóctones de leishmaniose em áreas onde o vetor está aparentemente ausente (Schantz *et al.*, 2005; Morosetti *et al.*, 2009; Gramiccia *et al.*, 2010) e por transfusão sanguínea de sangue total ou de fracções deste (Owens *et al.*, 2001; Paraguai De Souza *et al.*, 2001; Giger, Oakley, Owens & Schantz, 2002; De Freitas, Melo, Pimenta da Costa-Val & Marques-Michalick, 2006).

Apesar de só haver relatos de transmissão de *Leishmania* spp. por transfusão sanguínea em outras animais, todos os gatos dadores de sangue devem ser sujeitos a controlos periódicos através de métodos moleculares, devido ao crescente número de animais assintomáticos detetados desta forma (Marques *et al.*, 2013).

6. Epidemiologia

A leishmaniose constitui um grave problema para a Saúde Animal e Saúde Pública mundiais, sobretudo na bacia do Mediterrâneo, América do Sul e Médio Oriente (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

A emergência e/ou reemergência desta doença e a sua crescente importância, e de outras doenças transmitidas por vetores, na Europa, deve-se a vários fatores (Pennisi, 2014):

- a) alterações bioclimáticas, que promovem o aumento e dispersão dos vetores;
- b) alterações ambientais, que levam ao aumento de populações de animais silváticos que podem atuar como hospedeiros reservatórios;
- c) maior mobilidade de pessoas e animais em áreas endémicas ou destas para áreas não-endémicas;

- d) grandes populações de cães e gatos errantes e abrigos que não fazem um controlo adequado da saúde dos animais e a prevenção correta;
- e) ausência de cura completa para cães e gatos;
- f) entrada na Europa de outras espécies de *Leishmania* que não *L. infantum*.

Os últimos estudos efetuados em Portugal indicam um aumento do número de dias com temperaturas favoráveis para a atividade de *P. perniciosus* (Casimiro, Calheiros, Santos & Kovats, 2006).

Na última década, foi reportada a difusão de LCan em latitudes para norte, em áreas tradicionalmente classificadas como não endémicas, como o norte da Argentina, América do Norte (EUA e algumas províncias do sul do Canadá) e, ainda, norte e centro da Europa (Alemanha, Holanda e Reino Unido), o que se pensa ser devido a uma maior importação de cães vindos de regiões endémicas, ou que viajam para lá, seguida de transmissão transplacentária ou da hipótese de transmissão direta entre cães (Ready, 2010; Cardoso & Solano-Gallego, 2013; Otranto *et al.*, 2013).

Na Europa, como já referido, *L. infantum* é, atualmente, a única espécie conhecida de *Leishmania* spp. isolada em gatos (Pennisi, 2014). Assim, *L. infantum* é o agente etiológico da LCan, LHum e LFel na Europa.

Em países do Mediterrâneo, estima-se que 50% - 80% da população canina esteja infetada por *L. infantum* e que a prevalência da LCan varie 2% a 5% (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Em áreas endémicas, mais de 50% dos cães infetados estão aparentemente sãos (Cardoso & Solano-Gallego, 2013), sendo a prevalência da infeção maior que a prevalência da doença: 67% dos animais são seropositivos e/ou positivos ao PCR convencional, enquanto apenas cerca de 13% apresenta a doença (Solano-Gallego, Morell, Arboix, Alberola & Ferrer, 2001 citados por Francino *et al.*, 2006).

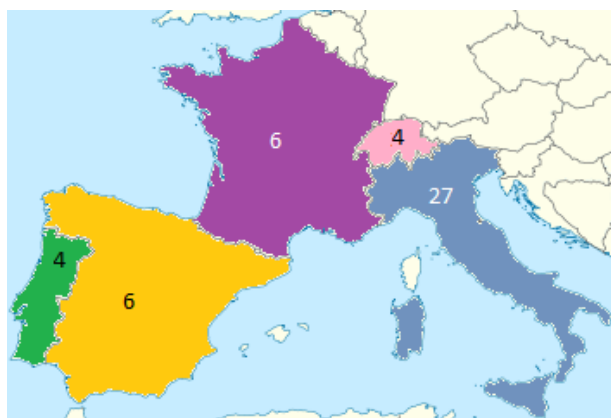
O número de casos de LCan em Portugal tem vindo a aumentar, estando, desde 2002, incluída no grupo das infeções de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010). No nosso país, identificam-se 4 focos endémicos de LCan: região de Trás-os-Montes e Alto Douro, AML, região do Algarve e a região de Évora (Campino & Maia, 2010). Mais recentemente, outras zonas do país são apontadas também como endémicas: Lousã, Alcanena, Santarém, Coimbra, Arganil, Proença-a-Nova, Sertã, concelho de Mação e a sub-região da Cova da Beira (Campino & Maia, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). A região de Trás-os-Montes e Alto Douro tem os maiores níveis de endemicidade de LCan (Cardoso, Lopes, Sherry, Schallig & Solano-Gallego, 2010). Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino (2007) realizaram um inquérito epidemiológico canino na área urbana/suburbana lisboeta e encontraram uma prevalência da infeção de 19,2% (Campino & Maia, 2010).

6.1 Epidemiologia da infecção por *Leishmania* spp. no gato e da leishmaniose felina

O primeiro caso de leishmaniose num gato doméstico por *L. infantum* foi descrito em 1912 por Sergent, Lombard & Quilichini, na Argélia, a partir de uma amostra de MO de um gatinho com 4 meses, que habitava numa casa onde um cão e uma criança também se encontravam infetados (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

No início do século XX, o gato era considerado um hospedeiro acidental devido aos casos clínicos esporádicos em países endémicos (Pennisi, 2014). Após os anos 80, o número de casos de LFel subiu, tendo sido reportados, de 1977 até 2014, um total de 47 casos clínicos de LFel na Europa (Figura 5) e 15 descrições histológicas de lesões em Espanha (Navarro *et al.*, 2010; Basso *et al.*, 2013; Pennisi, 2014). A LFel é esporadicamente reportada por todo o mundo, normalmente nas mesmas áreas onde a doença é endémica em cães e pessoas ou em gatos importados ou que viajaram para essas áreas (Mancianti, 2004; Pennisi *et al.*, 2013).

Figura 5. Número de casos clínicos de LFel reportados na Europa (1977 - 2014) (Original).



Legenda: verde - Portugal; amarelo – Espanha; roxo – França; rosa – Suíça; azul – Itália. Números representam o número de casos clínicos no respetivo país. Nota: Os casos diagnosticados na Suíça eram em gatos que tinham viajado ou que foram importados de Espanha.

Estudos epidemiológicos vieram confirmar que a infecção por *Leishmania* spp. nos gatos não é tão rara como anteriormente se pensava e que os gatos infetados se encontram normalmente em áreas endémicas, com algumas exceções: Europa (Portugal, Espanha, França, Itália, Suíça, Alemanha), América do Sul (Brasil, Argentina, Venezuela), México e Médio Oriente (Israel, Irão, Iraque, Jordânia) (Gramiccia, 2011; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

As seroprevalências obtidas, tanto no VM como no NM, variam entre 0% e 68,5%, semelhante à prevalência obtida por PCR, maioritariamente em sangue, que varia entre 0% e 60,7% (Anexo I e Anexo II) (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Esta variabilidade pode ser devido aos diferentes níveis de endemicidade, ao tipo de populações felinas estudadas ou às diferentes metodologias utilizadas (Pennisi, 2014).

O primeiro caso de LFel reportado em Portugal foi em 1994, por Costa-Durão, Rebelo, Peleteiro, Correia & Simões, numa gata adulta de Sesimbra, que possuía um nódulo cutâneo na região supraorbital esquerda (Garrido, 2012). Para além deste, conhecem-se mais 3 casos clínicos no nosso país (Marcos *et al.*, 2009; Sanches *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos realizados em Portugal permitiram obter valores de seroprevalências de 0% a 20% (Faria, 2008; Maia, Nunes & Campino, 2008; Rosa, 2009) (Anexo I) e prevalências obtidas por PCR entre 0,3% e 30,4% (norte e centro do país e AML, respetivamente) (Anexo II) (Maia *et al.*, 2008; Vilhena *et al.*, 2013).

No entanto, a prevalência de LFel é, regra geral, baixa, o que tem sido explicado por uma resistência natural do gato a esta infeção e por uma possível subestimação do número de casos, quer pela subnotificação da doença e pelo desconhecimento da mesma por parte dos médicos veterinários (Ayllón *et al.*, 2008), quer ainda pela apresentação clínica ser inespecífica e não patognomónica e poder ser confundida com outras doenças mais comuns nestes animais (Diakou, Papadopoulos & Lazarides, 2009).

Vários estudos em Portugal, França, Brasil, Itália, Espanha e Grécia concluíram que as seroprevalências em gatos são muito inferiores às encontradas nos cães da mesma área (Poli *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010). Esta diferença pode ser explicada por preferências dos vetores e por diferenças na resposta imunitária ou resistência inata dos gatos (Spada *et al.*, 2013). Também ao nível das prevalências obtidas por PCR existem diferenças entre as duas espécies, sendo o valor sempre superior nos cães (Maia *et al.*, 2010).

Vários fatores ou condições têm sido estudados de modo a avaliar se podem predispôr à infeção por *Leishmania* spp.: sexo (Pennisi *et al.*, 2000; Pennisi, 2002; Cardoso *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012), raça (Navarro *et al.*, 2010), idade (Tabar *et al.*, 2008a; Cardoso *et al.*, 2010; Ayllón *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012), habitat (rural/urbano) (Cardoso *et al.*, 2010), acesso ao exterior (Ozon *et al.*, 1999), altitude (Nasereddin, Salant & Abdeen, 2008), época de recolha das amostras (Pennisi *et al.*, 2012; Chatzis *et al.*, 2014), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) (Ayllón *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012), Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Sherry *et al.*, 2011) e doenças concomitantes e/ou condições imunossupressoras (Grevot *et al.*, 2005; Leiva, Lloret, Peña & Roura, 2005; Rüfenacht *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2011).

Alguns comportamentos típicos dos gatos podem favorecer a disseminação do parasita para estes, sobretudo nos animais com acesso ao exterior: a atividade predatória noturna, caminharem até cerca de 1,5 km de distância das suas casas e o coabitarem com reservatórios silváticos ou sinantrópicos (Braga, Langoni & Lucheis, 2014).

Maroli *et al.* (2007) em Itália e Silva *et al.* (2010) no Brasil concluíram, através de xenodiagnóstico, a capacidade de *Felis catus domesticus* com infecção crónica por *L. infantum* a transmitirem aos vetores (*P. perniciosus* e *L. longipalpis*, respetivamente), sugerindo que esta espécie funcione como hospedeiro reservatório secundário, e não somente como um hospedeiro accidental, em áreas onde a doença é endémica (Maia & Campino, 2011b; Gramiccia, 2011). Nestes estudos foi ainda demonstrado que a taxa de *P. perniciosus* e *L. longipalpis* infetados é semelhante à obtida em cães testados nas mesmas condições (Maia & Campino, 2011a). Não se sabe, no entanto, se gatos infetados seropositivos assintomáticos são capazes de infetar os vetores, como acontece nos cães (Pennisi & Solano-Gallego, 2013b). Maia *et al.* (2010) e Maia & Campino (2011a) consideram que o gato se tratará de um hospedeiro alternativo ao cão e não apenas um hospedeiro secundário, este último apenas capaz de transmitir a infecção sem conseguir manter a transmissão do parasita na ausência do hospedeiro primário, devido às seguintes condições:

- a) são naturalmente susceptíveis à infecção de carácter assintomático ou oligossintomático, com tendência para a cronicidade;
- b) elevada frequência com que os parasitas são detetados no sangue periférico em áreas endémicas;
- c) são uma das principais fontes alimentares sanguíneas dos flebótomos (*P. perniciosus* e *L. longipalpis*);
- d) transmitem os parasitas a vetores competentes (*P. perniciosus* e *L. longipalpis*);
- e) coabitam com humanos e animais naturalmente infetados;
- f) não recuperam sem tratamento específico anti-*Leishmania*.

Assim, os felinos domésticos têm um papel no ciclo de transmissão de *L. infantum*, no entanto a sua categorização como hospedeiros reservatórios primários ou secundários não é clara (Maia & Campino, 2011b).

7. Patogenia e Resposta Imunitária

Com a evolução, as espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos de resistência, tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados, que lhe permitem a permanência em ambientes extremos na população reservatória (Leifso, Cohen-Freue, Dogra, Murray & McMaster, 2007; Saz *et al.*, 2013)

Dentro dos fatores dependentes do parasita para a patogenia, os mais importantes são a espécie e respetivo zimodemo e a carga parasitária. Diferentes zimodemos têm diferentes

virulências e antigenicidades e, logo, diferentes respostas no hospedeiro vertebrado (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

À sua superfície, o parasita possui vários glicoconjugados, sendo considerados como fatores de virulência essenciais: a Glicoproteína 63 (GP63), que permite a endocitose pelos macrófagos ou a ligação das opsoninas (complemento, anticorpos, entre outros) para posterior fagocitose, e o Lipofosfoglicano (LPG), que permite a ligação das nectomonas às microvilosidades do epitélio gástrico do vetor, prevenindo a sua excreção durante a defecação (Bates, 2007; Alexandre-Pires & Correia, 2008; Tomás & Freitas Romão, 2008). O LPG é considerado o principal determinante da competência vetorial para *Leishmania* spp., uma vez que apresenta um polimorfismo estrutural bem definido entre as diferentes espécies do parasita, determinando o sucesso do seu desenvolvimento em diferentes espécies de flebótomos (Kamhawi, 2006).

Nos hospedeiros vertebrados, os parasitas desenvolveram os seguintes mecanismos de resistência: evasão à resposta imunitária inata, como a alteração do sistema de complemento; inibição do processamento e apresentação antigénica por parte das APC, como por exemplo, a inibição das moléculas do MHC-II; evasão aos mecanismos intramacrofágicos, nomeadamente às moléculas com capacidade leishmanicida (como o NO e os intermediários reativos de O₂); modulação do perfil de citocinas e indução da atividade de linfócitos T reguladores (Leifso *et al.*, 2007; Saz *et al.*, 2013).

No vetor, os mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pelo parasita são: indução da secreção da membrana peritrófica (proteoglicanos e quitina) pelo vetor, que retarda a difusão das proteases para dentro desta membrana e, logo, a sua ação sobre os parasitas; fixação das nectomonas ao estômago (através de lipofosfoglicanos (LPG) à sua superfície) para evitar a sua expulsão com as fezes; obstrução física e degradação da válvula estemodeal, esta última pela ação de quitinases produzidas pelas haptomonas; produção do gel secretor de promastigotas (PSG) (proteofosfoglicanos filamentosos) pelas leptomonas; secreção de um neuropéptido que diminui o peristaltismo do aparelho digestivo (Kamhawi, 2006).

Os fatores dependentes do hospedeiro vertebrado determinam mais diretamente a patogenia, sendo os primários: a constituição genética e, indiretamente, a capacidade de resposta imunitária, que condiciona o grau de resistência à infeção e a predisposição para desenvolver um ou outro tipo de doença, e os secundários: idade, sexo, estado nutricional e a presença de doenças concomitantes (Moreno *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Nos felinos não existem estudos acerca da resposta imunitária face à infeção por *L. infantum* (Pennisi, 2013), daí que o que se aborda é o que está estudado no cão.

No cão, sabe-se que o culminar da resposta imunitária pode ser: a resolução da infeção (por ser resistente à mesma ou por resolvê-la intermitentemente), infeção assintomática persistente ou doença ligeira a grave (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth, 2013). O progresso da infeção depende da eficácia da resposta desenvolvida pelo hospedeiro, do nível de exposição e da repetição da transmissão por vetores infetados (Otranto *et al.*, 2013).

Em síntese, podem ocorrer dois tipos de respostas imunitárias principais no caso da LCan: protetora ou susceptibilidade à doença. A imunidade protetora é mediada, sobretudo, por uma resposta celular com linfócitos T CD4+, também designados T helper (Th), com a produção de citocinas do tipo Th1, como Interferão gama (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), que estimulam a enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), presente no interior dos macrófagos, a produzir NO e outros radicais livres de O₂, que têm atividade leishmanicida. A este tipo de resposta estão associados anticorpos do tipo Imunoglobulina (Ig) G2 (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Saz *et al.*, 2013).

Na resposta imunitária que desencadeia uma susceptibilidade à doença ocorre uma redução da resposta celular, com um perfil misto de citocinas do tipo Th1 e Th2, que promovem uma resposta humoral marcada e não protetora, com uma elevada produção de anticorpos anti-*Leishmania*, sobretudo IgG1 e IgE (Alexandre-Pires & Correia, 2008; Saz *et al.*, 2013). Como consequência da contínua estimulação antigénica, ocorre uma proliferação massiva de linfócitos B e células plasmáticas e, logo, de anticorpos (Baneth & Solano-Gallego, 2012a).

Nos gatos, não se encontra ainda definido o momento da seroconversão, no entanto, no estudo de Simões-Mattos *et al.* (2005), com a infeção experimental de gatos com *L. braziliensis*, a seroconversão ocorreu entre as 2 e as 20 semanas pós-infeção, com 50% dos animais seropositivos às 12 semanas e com o pico de produção cerca das 26 semanas pós-infeção.

Na maioria dos estudos, os anticorpos específicos anti-*Leishmania* estão ausentes ou são muito baixos, sobretudo em gatos infetados, o que indica que a maioria dos gatos não sofrerá do desequilíbrio da resposta imunitária que leva à sobreprodução de anticorpos, tal como ocorre nos cães (Maia & Campino, 2011b). Acredita-se que nos gatos a resposta é maioritariamente celular, a qual parece ser efetiva no controlo da infeção e conferir um certo grau de resistência natural à mesma na ausência de fatores imunossupressores, como FIV, FeLV, stress, senilidade e outras doenças mieloproliferativas (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011).

A resistência natural à infeção foi sugerida por infeções experimentais nas quais se verificou a cura espontânea de lesões (Kirkpatrick, Farrell & Goldschmidt, 1984; Simões-Mattos *et al.*, 2005) e em gatos naturalmente infetados que apresentaram escassas alterações clínicas e patológicas (Navarro *et al.*, 2010).

De acordo com Mancianti (2004), a maior resistência natural dos gatos a esta infecção e ao desenvolvimento da doença é, provavelmente, determinada por fatores genéticos, não estritamente relacionados com a imunidade celular, tendo em conta o exemplo deste autor, em que existia uma elevada seroprevalência da infecção por FIV (30%) mas poucos casos clínicos de LFel em Itália.

A baixa produção de anticorpos, também pode ser explicada por, em caso de doença, a forma mais comum ser a cutânea (Solano-Gallego *et al.*, 2007). São necessários mais estudos para determinar se a baixa produção de anticorpos e a ausência de sinais clínicos são devidos a um equilíbrio entre sistema imunitário e a presença do parasita ou se conseguem controlar a infecção através da eliminação do parasita (Maia & Campino, 2011b).

Todos os gatos doentes possuem anticorpos específicos anti-*Leishmania*, sendo a hiperglobulinémia frequentemente encontrada e, tal como nos cães, gatos saudáveis positivos no PCR podem ser seronegativos. Esta espécie pode manter-se positiva ao PCR e à serologia durante um longo período de tempo (Pennisi *et al.*, 2013).

As lesões observadas na LCan devem-se a numerosos mecanismos imunopatológicos, sendo os mais importantes: a produção de complexos antígeno-anticorpo circulantes que se depositam em várias estruturas (glomérulo renal, sinóvia, vasos sanguíneos e estruturas oculares) e o desencadeamento de reações inflamatórias granulomatosas/piogranulomatosas ou linfoplasmocíticas (Saz *et al.*, 2013).

Estão descritos vários casos em gatos em que a invasão dos tecidos pelos parasitas desencadeia uma resposta inflamatória granulomatosa difusa, sem a típica forma nodular, caracterizada por um infiltrado difuso de macrófagos contendo inúmeros parasitas, um número variável de linfócitos e plasmócitos e, em menor número, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Navarro *et al.*, 2010).

Existe apenas um estudo acerca da imunidade local contra esta infecção no gato. Neste, realizado por Hervás *et al.* (2002), foi analisado, por imunohistoquímica (IHQ), um infiltrado celular e as citocinas associadas à infecção em lesões cutâneas, oculares e orais de um felino coinfetado por FIV. Encontrou-se, em lesões granulomatosas cutâneas e oculares, um elevado número de linfócitos CD3+, células plasmáticas, juntamente com uma elevada expressão de antígenos-MHC-II por linfócitos e macrófagos, evidenciando uma boa resposta imunitária local (tipo IV), que poderá ser responsável pelo controlo da infecção, incluindo em gatos FIV e FeLV positivos. Assim, quando esta imunidade não é efetiva pode surgir a doença (Dalmau *et al.*, 2008).

8. Diagnóstico

Para o diagnóstico de LFel deve ser tido em conta a anamnese e dados epidemiológicos da região, os sinais clínicos e alterações clinicopatológicas do paciente e os resultados de métodos parasitológicos, serológicos e moleculares (Gramiccia, 2011). Várias técnicas de diagnóstico, individualmente ou combinadas, têm sido aplicadas para pesquisa de *Leishmania* spp. (Lombardo *et al.*, 2012).

Há que fazer a distinção entre infecção por *Leishmania* spp. e a doença. No cão está definido que um indivíduo que não apresente sinais clínicos no exame físico nem alterações clinicopatológicas nos testes laboratoriais de rotina (hemograma, bioquímicas e urianálise), mas que tenha resultados laboratoriais positivos para a presença do parasita ou de anticorpos, significa que o animal possui ou contactou, respetivamente, com o parasita, mas não implica que esteja doente ou que venha a desenvolver a doença. Um animal com leishmaniose apresenta sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas e tem a infecção confirmada (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

8.1 Diagnóstico Clínico

Previamente ao exame clínico, há que realizar uma história pregressa completa e conhecer a área onde o animal habita, nomeadamente se vive em e/ou se viaja para zonas endémicas de leishmaniose, se tem acesso à rua e em que momentos do dia, se tem alguma doença imunossupressora, entre outras questões.

Sabe-se que, em áreas endémicas, 75 a 100% dos gatos infetados não desenvolvem sintomatologia, tal como nos cães (Maia & Campino, 2011a). Quando existe sintomatologia, a forma cutânea com dispersão visceral do parasita é a mais comum (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Gramiccia, 2011). No entanto, outras espécies de *Leishmania* serão responsáveis pelo aparecimento de formas estritamente cutâneas (Martín-Sánchez *et al.*, 2007).

A forma cutânea caracteriza-se, essencialmente, por dermatite nodular ou difusa, papular, pustular ou ulcerativa, alopecia difusa ou localizada e, por vezes, descamação, erosões, eritema e seborreia. Estas lesões localizam-se, sobretudo, nas regiões do corpo com menos pêlo (zonas glabras), locais prediletos de alimentação dos flebótomos: cabeça (lábios, pavilhão auricular, nariz e região periorbital) e pescoço, e, por vezes, no torác, abdómen, membros e cauda (Navarro *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012; Pereira da Fonseca, Saraiva-Marques, Basso & Garrido, 2013). Assim, as lesões localizam-se sobretudo na pele, tecido ocular e junções mucocutâneas (Navarro *et al.*, 2010).

O prurido está normalmente ausente (Pennisi *et al.*, 2013). Pode também ocorrer hiperpigmentação, hiperqueratose, liquenificação e exsudação na região cervical dorsal e no

abdômen (Vides *et al.*, 2011). Pennisi, Venza, Reale, Vitale & Giudice (2004) encontraram quistos hemorrágicos cutâneos, os quais nunca foram reportados em cães. Pennisi (2013) analisou 41 dos 47 casos reportados na Europa, em que 50% dos animais apresentaram lesões cutâneas, sendo a dermatite ulcerativa a mais frequente. Em poucos casos, as lesões cutâneas eram o único sinal (Pennisi, 2013) (Figura 6).

Figura 6. Lesões cutâneas em gatos naturalmente infectados por *L. infantum* - (A) (Pennisi, 2002) e (C) (Garrido, 2012) - e *L. chagasi* (B e D) (Vides et al., 2011).



Legenda: A – úlcera cutânea; B – zona cervical exibindo alopecia, eritema e exsudação; C – nódulos cutâneos nos pavilhões auriculares; D – alopecia na superfície externa do pavilhão auricular, com eritema e crostas.

Também foram reportados outros sinais clínicos, relacionados com a forma visceral, menos comum, bastante inespecíficos e semelhantes a outras doenças. O sinal clínico mais comum foi a linfadenomegália (Tabela 3) (Pennisi, 2013; Pennisi *et al.*, 2013).

Em vários estudos, a prevalência de lesões oculares encontrada foi elevada, sendo a uveíte a mais frequentemente observada (Figura 7) (Pennisi, 2013).

A infecção por *Leishmania* spp. pode estar associada, concomitantemente, com outras doenças dermatológicas (pênfigo foliáceo, carcinoma das células escamosas, complexo eosinofílico felino e demodecose), por isso, quando gatos aparecerem com lesões nodulares, ulcerativas ou com crostas, lesões cutâneas, mucocutâneas ou oculares, a leishmaniose deve fazer parte dos diagnósticos diferenciais e ser investigada, sobretudo em áreas endêmicas da doença (Navarro *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011).

Tabela 3. Sinais clínicos mais e menos frequentemente reportados (Adaptado de Navarro *et al.*, 2010; Ayllón *et al.*, 2011; Maia & Campino, 2011a; Vides *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi, 2013).

Mais frequentes		Menos frequentes	
Perda de peso	Uveíte, blefarite, panoftalmite	Conjuntivite, coriorretinite, queratite, opacidade da córnea, corrimento mucopurulento bilateral	
Anorexia	Gengivostomatite crónica	Mucosas pálidas	Hepatomegália
Letargia	Desidratação	Icterícia	Febre
		Vômito	Diarreia
		Esplenomegália	PU/PD
		Aborto recorrente	IRC
		Dispneia, rinite, corrimento mucopurulento bilateral	
		Nódulos no fígado, baço e/ou rins	

Legenda: PU: Poliúria; PD: Polidipsia; IRC: Insuficiência Renal Crónica.

Figura 7. Uveíte aguda com coágulo de fibrina (seta) num gato FIV positivo com LFel (Adaptado de Pennisi, 2013).



Quando estão presentes outras doenças, a única forma de confirmar se os sinais clínicos serão devidos à leishmaniose é através da demonstração da presença do parasita nos órgãos ou tecidos afetados, da presença de inflamação granulomatosa/piogranulomatosa e, o mais importante, da resposta a um tratamento anti-*Leishmania* (Chatzis *et al.*, 2014).

8.2 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser direto, que se baseia na deteção do parasita, ou indireto, que avalia a resposta imunitária do hospedeiro face ao parasita (Gramiccia, 2011).

Atualmente, não existe nenhum *gold standard* (100% de sensibilidade e de especificidade) para o diagnóstico da doença e da infeção (Rodríguez-Cortés, Ojeda, Todoli & Alberola, 2013).

Nos cães, consideram-se os métodos serológicos quantitativos e a demonstração de ADN do parasita por técnicas moleculares como a abordagem mais útil para o diagnóstico da infeção (Solano-Gallego, Villanueva-Saz, Carbonell, Trotta, Furlanello & Natale, 2014).

Nos gatos, a validação de testes de diagnóstico de infeção por *Leishmania* spp. ainda é escassa e a comparação dos resultados dos diferentes estudos não é fiável devido às vastas metodologias aplicadas (Pennisi, 2014).

8.2.1 Diagnóstico Direto ou Parasitológico

8.2.1.1 Exame citológico

É considerada a melhor técnica de diagnóstico, a mais vantajosa, simples e económica, por ser capaz de detetar diretamente o parasita (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Srividya, Kulshrestha, Singh & Salotra, 2012).

Através desta técnica, pode observar-se as formas amastigotas, no interior de macrófagos ou livres, através de esfregaços corados de diferentes amostras biológicas, destacando-se: pele, linfonodos, MO, baço ou sangue periférico. A coloração é feita com um dos seguintes corantes: Giemsa, Wright, Diff-Quik[®] ou Leishman (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Saz, 2013).

As grandes vantagens da citologia são: poder ser realizada em qualquer momento na clínica, ser pouco invasiva e ser de rápida leitura (Solano-Gallego & Saz, 2013). Tem como inconvenientes: não permitir, por vezes, detetar o parasita em fases iniciais da doença, em animais assintomáticos ou durante o tratamento, devido à baixa carga parasitária (Roura, 2007 citado por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), e a presença de possíveis artefactos (Baneth & Aroch, 2008 citados por Solano-Gallego & Saz, 2013).

A especificidade é elevada (100%), embora a sensibilidade seja muito variável, dependendo da carga parasitária do tecido escolhido, da qualidade do esfregaço, da capacidade do observador e do número de campos observados (Chatzis *et al.*, 2014).

A carga parasitária pode ser estimada através da contagem do número de amastigotas em relação ao número de leucócitos (Maia & Campino, 2008). A presença de uma única célula com o parasita é considerada um resultado positivo de infeção (Corrales & Moreno, 2006 citados por Garrido, 2012).

Rosa (2009) compilou a informação de 49 casos clínicos de LFel a nível mundial até 2009, e dos 45 casos clínicos em que foram utilizados exames citológicos ou histológicos para confirmar o diagnóstico de infeção, o parasita foi observado com maior frequência em: lesões cutâneas (n= 29), linfonodos (n= 15), MO (n= 5), fígado (n= 3), baço (n= 3), olhos (n= 2), sangue (n= 2) e intestino e estômago (n= 1).

Num estudo de Perillo *et al.* (2013), a única alteração citológica encontrada em 20 gatos positivos para *L. infantum* por PCR foi hiperplasia linfóide.

Nos gatos, o diagnóstico definitivo é, normalmente, conseguido através de métodos diretos, como a citologia, cultura *in vitro* ou técnicas moleculares (Gramiccia, 2011). A citologia tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de gatos que apresentam sinais clínicos compatíveis com LFel, no entanto não está recomendada como um método sensível de diagnóstico em estudos epidemiológicos (Chatzis *et al.*, 2014).

8.2.1.2 Exame histopatológico

Esta técnica utiliza um fragmento de biópsia de um tecido ou órgão com o objetivo de visualizar formas amastigotas, permitindo fazer também o diagnóstico diferencial com outras patologias, como o carcinoma das células escamosas (Garrido, 2012). As amostras são coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Paltrinieri *et al.*, 2010).

A sensibilidade desta técnica é bastante variável (14-50% em cães), consoante a carga parasitária, daí que seja aconselhável utilizar-se simultaneamente técnicas imunohistoquímicas (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Moreira, Luvizotto, Garcia, Corbett & Laurenti (2007) descobriram que, em cães, o material proveniente do linfonodo poplíteo era o mais efetivo na deteção do parasita, sobretudo em animais sintomáticos, seguido do baço e da MO (Maia & Campino, 2008).

A lesão histopatológica mais frequentemente encontrada em animais com LFel é uma reação inflamatória granulomatosa difusa com macrófagos infetados, linfócitos CD3+ e plasmócitos, reportada na pele, olho, fígado, baço e rim (Pennisi, 2013).

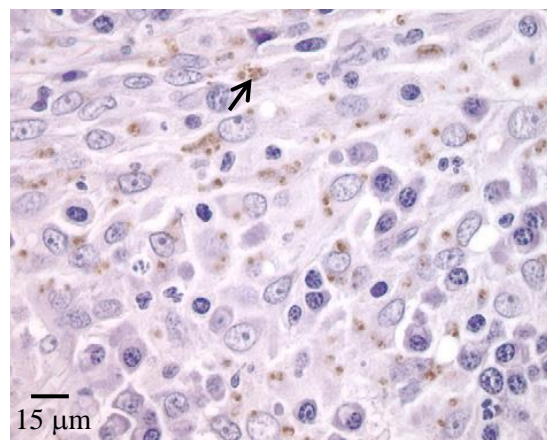
Navarro *et al.* (2010) obtiveram na histopatologia de lesões de pele, uma dermatite granulomatosa difusa caracterizada por um infiltrado difuso de macrófagos contendo inúmeros parasitas, um número variável de linfócitos e plasmócitos e, em menor número, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, ou uma perifoliculite granulomatosa e uma reação tecidual liquenóide ou dermatite de interface, com um baixo número de parasitas.

Ainda nesse estudo, as alterações esplénicas, hepáticas e renais, observadas em 15 gatos, foram semelhantes às já encontradas em cães: desorganização da polpa esplénica branca, com poucos linfócitos ao redor da arteríola central e aumento do número de plasmócitos e macrófagos na polpa vermelha, inflamação intersticial renal e infiltração hepática periportal, rica em macrófagos parasitados, linfócitos e plasmócitos (Maia & Campino, 2011a).

8.2.1.3 Imunocitoquímica (ICQ) e imunohistoquímica (IHQ)

Esta técnica é muito sensível e específica, sendo utilizada frequentemente como complemento da histopatologia (Solano-Gallego & Saz, 2013). Baseia-se na detecção de um determinado antígeno de *Leishmania* nos tecidos, utilizando anticorpos associados a marcadores (Figura 8) (Lunedo *et al.*, 2012). Estes anticorpos podem ser: anticorpos provenientes de um animal infectado (soro hiperimune) ou anticorpos mono ou policlonais (Tafari *et al.*, 2004 citados por Solano-Gallego & Saz, 2013). Dentro desta técnica, a mais utilizada é a imunoperoxidase (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Figura 8. IHQ de uma biópsia de nódulo cutâneo de um gato, evidenciando *Leishmania* spp. (seta) no interior de macrófagos (coloração HE) (Adaptado de Navarro *et al.*, 2010).



Tanto estas técnicas como a histopatologia têm como inconvenientes: a necessidade de laboratórios e instalações apropriadas, pessoal qualificado e treinado para a sua realização e interpretação e possibilidade de ocorrência de artefactos (Baneth & Aroch, 2008). Caso estas técnicas não sejam conclusivas ou se detetem as alterações típicas mas não o parasita em si, é aconselhado a realização de PCR (Paltrinieri *et al.*, 2010).

8.2.1.4 Cultura *in vitro* e *in vivo*

A cultura *in vitro* consiste na colocação de tecidos suspeitos (linfonodo, MO, pele, sangue, entre outros) num meio de cultura, seguida da sua respetiva observação semanalmente. Geralmente, considera-se negativa uma cultura quando ocorrem 4 subculturas consecutivas negativas, espaçadas de uma semana (Maia & Campino, 2008). Esta técnica pode melhorar a sensibilidade da detecção, no entanto nem todas as espécies de *Leishmania* crescem à mesma velocidade e nem todos os tecidos têm a mesma quantidade de parasitas (Maia & Campino, 2008).

Em gatos, já foram utilizados os tecidos acima referidos (Solano-Gallego & Saz, 2013). No entanto, o sangue não é um bom tipo de amostra para realizar cultura (Martín-Sánchez *et al.*, 2007).

A cultura *in vivo* consiste, normalmente, na inoculação de hamsters e monitorização posterior dos sinais clínicos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Estas técnicas têm uma especificidade de 100%, uma vez que permitem o desenvolvimento de promastigotas viáveis, sendo, sobretudo, utilizadas em investigação (Gramiccia, 2011) e facilita a identificação isoenzimática ou molecular do parasita (Solano-Gallego & Saz, 2013). Ambas são técnicas muito demoradas (30 dias na *in vitro* e até vários meses na *in vivo*), pode ocorrer contaminação fúngica ou bacteriana e a cultura *in vivo* é bastante dispendiosa (Maia & Campino, 2008).

8.2.1.5 Xenodiagnóstico

É uma técnica para a deteção do parasita no seu vetor natural, depois deste se ter alimentado de um animal suspeito (Maia & Campino, 2008). Os estudos de Maroli *et al.* (2007), utilizando *P. perniciosus*, e de Silva *et al.* (2010), com *L. longipalpis*, são exemplos da aplicação desta técnica em gatos. Apesar de ser extremamente específico e sensível, este método é utilizado, sobretudo, para responder a algumas questões epidemiológicas e é o ideal para o estudo de fármacos com atividade repelente, requerendo um laboratório e técnicos especializados (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011; Solano-Gallego & Saz, 2013).

8.2.1.6 Técnicas moleculares – PCR

A técnica de PCR é rápida, fiável e muito sensível para o diagnóstico da infeção por *Leishmania* spp.. É bastante útil para confirmação do diagnóstico, não só em casos ativos, mas, principalmente, durante e após a realização de tratamentos, em portadores crónicos/assintomáticos e, ainda, na identificação da espécie em causa (Maia & Campino, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Gramiccia, 2011).

Permite detetar quantidades mínimas de ADN do parasita em tecidos infetados, através da amplificação de sequências específicas do seu genoma, para a qual são necessárias sequências iniciadoras específicas, designadas de *primers* (Maia & Campino, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Os *primers* são oligonucleótidos com uma sequência de nucleótidos complementar às regiões flanqueadoras do fragmento a amplificar. Cada *primer* (*forward* e *reverse*) liga-se a cada uma das cadeias de ADN, permitindo a ligação de uma enzima termoestável, ADN polimerase, para dar início à síntese das cadeias de ADN alvo (Garrido, 2012).

Os *primers* podem ter como alvo: uma pequena subunidade de um gene de Ácido Ribonucleico ribossômico (rARN), a região conservada de um minicírculo de kADN ou outras sequências altamente repetitivas de ADN do genoma nuclear (Gramiccia, 2011; Solano-Gallego & Saz, 2013).

As técnicas que utilizam os minicírculos de kADN parecem ser mais sensíveis (Solano-Gallego & Saz, 2013), uma vez que o cinetoplasto é constituído por cerca de 10.000 minicírculos de kADN (Noyes, Reyburn, Bailey & Smith, 1998; Nicolas, Prina, Lang & Milon, 2002), enquanto que outras regiões que possam ser marcadas têm, apenas, cerca de 200 cópias por célula (Pilatti, De Almeida Ferreira, Melo & De Andrade, 2009).

Cada minicírculo possui uma região variável e uma região conservada. Esta última de, aproximadamente, 120 pares de bases (pb), constitui o alvo de amplificação, possuindo cada parasita cerca de 10.000 cópias dessa região (Noyes *et al.*, 1998; Nicolas *et al.*, 2002). Weirather *et al.* (2011) concluíram que não existem diferenças significativas entre o número de cópias de minicírculos entre promastigotas e amastigotas.

A eficácia da PCR depende de diferentes fatores como: *primers* utilizados, número de cópias, método de extração do ADN, amostra biológica e protocolo adotado (Maia & Campino, 2008). As principais desvantagens da técnica de PCR são: o custo elevado e o facto de um resultado positivo não confirmar a doença (Lombardo *et al.*, 2012).

Na maioria dos estudos realizados em gatos, a sensibilidade da deteção do parasita foi muito superior através de PCR comparativamente à serologia (Martín-Sánchez *et al.* 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Millán *et al.*, 2011; Sherry *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012). Perillo *et al.* (2013) afirmam que, em gatos, a sensibilidade do PCR é muito superior à da serologia e citologia, tal como descrito nos cães.

Nos gatos, vários são os autores que concluíram que o diagnóstico da infeção por *L. infantum* e de LFel deve incluir técnicas moleculares (Maia *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Maia & Campino, 2011a).

Com o objetivo de inovar a técnica de PCR convencional, outras técnicas têm sido descritas, que aumentam sobretudo a sensibilidade, nomeadamente PCR quantitativo ou PCR em tempo real (qPCR) (Solano-Gallego & Saz, 2013).

Esta técnica, que é quantitativa ao contrário da PCR convencional, permite monitorizar em tempo real a reação de amplificação de sequências específicas de ADN, detetando e quantificando um sinal fluorescente, que é depois traduzido no número de cópias de ADN parasitário presente na amostra (Maia & Campino, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010).

As principais vantagens sobre a técnica convencional são: rapidez, redução do risco de contaminação (por se realizar em sistema fechado), maior sensibilidade e fornecer o número

exato de cópias (Maia & Campino, 2008). A técnica de PCR convencional só é positiva em amostras com cargas parasitárias superiores a 30 parasitas/mL de amostra, enquanto que a de qPCR é positiva a partir de 0,2 parasitas/mL de amostra (Francino *et al.*, 2006 citados por Garrido, 2012). Segundo Martínez *et al.* (2011), a técnica de qPCR tem mesmo a capacidade de detetar 0,01 a 10.000 parasitas por amostra (Hernández *et al.*, 2015).

A técnica de qPCR revela-se muito útil por possibilitar a observação das variações da carga parasitária ao longo da infeção e a monitorização durante e após o tratamento, prevenindo recidivas (Hernández *et al.*, 2015). É, sobretudo, utilizada para o diagnóstico em casos inconclusivos de métodos serológicos, quando ainda não ocorreu seroconversão (Martínez *et al.*, 2011).

Um resultado positivo na PCR indica a presença de ADN de *Leishmania* spp., que pode provir de amastigotas viáveis ou não (Lombardo *et al.*, 2012). Contudo, um estudo *in vitro* de Prina, Roux, Mattei & Millon (2007) sugere que a deteção de ADN de *Leishmania* spp. por qPCR provém, maioritariamente, de parasitas intactos e que o ADN nuclear e cinetoplasmático é rapidamente degradado após a morte dos amastigotas (Lombardo *et al.*, 2012). Por tudo isto, não está recomendado o tratamento de animais saudáveis com fármacos anti-*Leishmania* com base somente num PCR positivo (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No cão, um resultado negativo num animal clinicamente suspeito não é suficiente para excluir a infeção (Maia & Campino, 2008), uma vez que a amplificação do agente pode falhar caso tenham sido realizado um tratamento prévio, já tenha havido eliminação do agente pelo sistema imunitário do hospedeiro (Tabar *et al.*, 2008a) ou pelo facto de diferentes tecidos de um mesmo cão infetado apresentarem diferentes sensibilidades e especificidades (Maia & Campino, 2008).

Existe, ainda, a PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que é utilizada para a identificação da espécie ou estirpe de *Leishmania* diretamente a partir da amostra, sem o isolamento do parasita como na análise isoenzimática, e através da qual se concluiu que não existem diferenças genéticas nem fenotípicas entre as estirpes isoladas em cães e gatos (Gramiccia, 2011; Pennisi, 2014).

A técnica de PCR pode ser realizada numa grande variedade de materiais biológicos. Nos gatos, os mais utilizados são, por ordem decrescente: linfonodo, sangue, pele, zaragatoas orais e conjuntivais (ZC) (Pennisi, 2013), variando entre eles a sensibilidade e especificidade. Tal deve-se à carga parasitária variar consoante o tecido, devido ao tropismo da estirpe de *Leishmania* e à imunidade específica de cada órgão (Francino *et al.*, 2006; Maia & Campino, 2008). No cão, sabe-se que este parasita apresenta um maior tropismo para órgãos linfohematopoiéticos, sendo a carga parasitária superior nestes órgãos (Saz *et al.*, 2013).

Vita, Santori, Aguzzi, Petrott & Luciani (2005) afirmam que a MO e linfonodos são o melhor material biológico a utilizar nos gatos. Para além disso, Pennisi *et al.* (2012) concluíram que a técnica de PCR em linfonodo e em células conjuntivais (CC) obtidas por ZC é mais sensível comparativamente com amostras de sangue.

A recolha de amostras de MO, baço ou linfonodo é bastante invasiva e, por isso, outro tipo de amostras não invasivas e, logo, mais periféricas, têm vindo a ser estudadas (Geisweid, Weber, Sauter-Louis & Hartmann, 2013), por ser mais simples e menos dolorosa a sua colheita e por ser mais fácil a aceitação por parte dos proprietários, possibilitando ainda a realização de várias recolhas com um curto período de tempo entre elas (Di Muccio *et al.*, 2012). Estas amostras não invasivas são todas aquelas que não requerem a penetração da pele ou das mucosas para a sua obtenção (Baneth, 2013), tendo sido já utilizadas: urina, pêlo, CC e zaragatoas oral, nasal, vulvar e auricular (Hernández *et al.*, 2015).

Em vários estudos em gatos, a prevalência de lesões oculares encontrada foi elevada (Pennisi, 2013), tal como nos cães, nos quais a prevalência varia entre 16 a 80% (Giménez, Repiso & Freixa, 2013), tendo sido revelado que a conjuntiva é uma boa fonte de ADN de *Leishmania* spp. (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Andrade & Melo, 2013).

Este parasita pode atingir o olho, e mais precisamente a conjuntiva, por infeção direta através das picadas dos flebótomos à volta dos olhos dos hospedeiros (Di Muccio *et al.*, 2008), por via hematogénea (Reithinger *et al.*, 2002) ou, mais provavelmente, por via linfática (Strauss-Ayali, Jaffe, Burshtain, Gonen & Baneth, 2004).

Uma vez que as mucosas têm uma elevada proliferação celular e geram constantemente células esfoliativas, o uso de zaragatoas para a colheita deste material biológico é prático (De Almeida Ferreira *et al.*, 2013). Para além disto, as ZC são ainda fáceis de armazenar e têm um baixo custo. Pelo conjunto de todas as suas vantagens, são úteis em trabalhos de campo e estudos epidemiológicos (De Almeida Ferreira, Ituassu, Melo & De Andrade, 2008).

Em gatos, os estudos existentes utilizando CC são em menor número comparativamente com os de cães, no entanto concluiu-se que é um método sensível e económico, apresentando resultados promissores no diagnóstico da infeção por *Leishmania* spp. (Pennisi *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013). As prevalências da infeção por *Leishmania* spp. obtidas por este tipo de amostra nos gatos são: 3,1% na Grécia (Chatzis *et al.*, 2014), 16,7% em Itália (Pennisi *et al.*, 2012) e 23,1% em Portugal (Marques *et al.*, 2013).

No caso dos cães, verificou-se que a utilização deste tipo de amostra é útil também na identificação de animais infetados antes da seroconversão e na monitorização durante o tratamento para a deteção precoce de recidivas (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Di Muccio *et al.*, 2008; Di Muccio *et al.*, 2012). A sensibilidade obtida nos vários estudos em cães variou,

maioritariamente, entre 73,9% e 95,6%, com exceção de Lombardo *et al.* (2012) que foi apenas 43%, e foi semelhante em animais sintomáticos e assintomáticos (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Pilatti *et al.*, 2009; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012; Di Muccio *et al.*, 2012; Geisweid *et al.*, 2013; Ceccarelli, Galluzzi, Sisti, Bianchi & Magnani, 2014). A especificidade variou entre 93,8% e 100% (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Geisweid *et al.*, 2013; Ceccarelli *et al.*, 2014).

Este método tem o inconveniente da quantidade de material biológico na amostra colhida ser variável, podendo variar entre diferentes colheitas do mesmo paciente, por exemplo em fase de tratamento, afetando a sensibilidade e a quantificação correta do parasita (Ceccarelli *et al.*, 2014). Concluindo, a técnica de PCR aplicada a CC, obtidas por ZC, é um ótimo método molecular para a detecção da infecção em estudos epidemiológicos e é indicado para situações clínicas em que a utilização de meios invasivos é indesejável (Baneth, 2013).

As prevalências utilizando sangue como amostra biológica na técnica de PCR em gatos variam de 0% a 30,4%, dados provenientes de estudos realizados na Europa, com uma prevalência muito elevada, em Itália, no estudo de Pennisi (2002), de 61% (Anexo II) (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Em Portugal, a prevalência da infecção determinada por PCR de sangue varia entre 0,3% (Vilhena *et al.*, 2013) e 30,4% (Maia *et al.*, 2008), ambas as técnicas eram qPCR em kADN (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

8.2.2 Diagnóstico Indireto

8.2.2.1 Diagnóstico Serológico

Este tipo de diagnóstico tem sido o mais utilizado para o diagnóstico de LFel (Pennisi, 2014), tal como ocorre nos cães, e consiste na detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* no soro, plasma ou sangue dos hospedeiros, avaliando desta forma a resposta imunitária humoral face à infecção por *Leishmania* spp. (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

No gato, os métodos serológicos mais utilizados são: Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Teste de Aglutinação Direta (TAD) e *Western Blot* (WB) (Pennisi & Solano-Gallego, 2013b), sendo estas as abordadas nesta dissertação.

Consoante a técnica, varia a sensibilidade e especificidade (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), no entanto as mais utilizadas mostram frequentemente uma especificidade muito elevada (perto dos 100%) no caso do cão (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Os antígenos utilizados podem ser: parasita completo, extratos solúveis do parasita, proteínas recombinantes ou proteínas purificadas (Solano-Gallego & Saz, 2013). As técnicas que utilizam parasitas completos são mais sensíveis e, logo, menos específicas, sendo mais

provável a ocorrência de reações cruzadas com outros agentes patogénicos (Spada *et al.*, 2013).

A deteção de anticorpos não implica a presença de uma infeção ativa, apenas significa que houve exposição ao parasita e se desenvolveu uma resposta imunitária humoral (Tabar *et al.*, 2008a; Maia & Campino, 2011b).

Os gatos infetados por *Leishmania* spp. mantêm-se, geralmente, seronegativos ou com um baixo título de anticorpos específicos, daí que a serologia convencional não seja um método muito útil e fiável nesta espécie (Poli *et al.*, 2002; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia & Campino, 2011a). Como já referido, vários autores sugerem que a resposta imunitária dos gatos face à infeção por *Leishmania* spp. é diferente da dos cães, sendo, sobretudo, do tipo celular, que confere uma maior resistência à infeção, ocorrendo um maior número de animais assintomáticos e baixos títulos de anticorpos (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011).

As técnicas qualitativas (testes rápidos) têm uma interpretação diferente das quantitativas (Solano-Gallego & Saz, 2013).

Os testes qualitativos são rápidos, de fácil leitura e interpretação e têm uma especificidade relativamente alta. No entanto, a sua sensibilidade é baixa a moderada. Idealmente, os testes rápidos quando positivos, devem ser seguidos de um teste quantitativo (Solano-Gallego & Saz, 2013).

As provas quantitativas classificam o título de anticorpos em: negativo, duvidoso, positivo baixo, médio ou alto (Solano-Gallego *et al.*, 2009), sendo esta a principal vantagem. As desvantagens são o facto de se utilizar um limiar de positividade e metodologias diferentes consoante o laboratório e a necessidade de repetir (30 dias depois) ou de recorrer a outros métodos quando o resultado é positivo baixo ou perto do limiar de positividade (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego & Saz, 2013).

Em ambos os tipos de testes podem ocorrer falsos negativos, devido à sua baixa sensibilidade nas seguintes situações: ausência de seroconversão em animais infetados (por resistência inata); durante o período de seroconversão; quando a seroconversão não é permanente (devido ao desenvolvimento de uma resposta humoral ou celular) ou quando ainda não foram produzidos os anticorpos específicos que são detetados (Manna *et al.*, 2004; Maia, Ramada, Cristóvão, Gonçalves & Campino, 2009b). Por outras palavras, ocorrem em infeções recentes e em animais infetados assintomáticos (Leite, De Almeida Ferreira, Ituassu, De Melo & De Andrade, 2010) ou, ainda, em fase de remissão da doença (Ceccarelli *et al.*, 2014).

A maioria das técnicas serológicas tem ainda a desvantagem de poder ocorrer falsos positivos devido a reações cruzadas com: anticorpos específicos produzidos contra outros agentes

infeciosos, que apresentam determinantes antigénicos e proteínas comuns à espécie de *Leishmania* em estudo (Braga *et al.*, 2014), ou com autoanticorpos felinos (Grant, Fink, Sundstrom, Torbett & Elder, 2009; Nishii *et al.*, 2011 citados por Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Nos gatos, está provado que ocorrem reações cruzadas na presença de *Trypanosoma cruzi* (sobretudo no NM) e outras espécies de *Leishmania*, tal como nos cães (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Apesar de não estar provado cientificamente, outros agentes poderão ainda causar estas reações: *Rickettsia felis*, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* e *Toxoplasma gondii* (Spada *et al.*, 2013).

Verificou-se que nos gatos infetados com FIV ocorre uma ativação policlonal, que leva a uma prevalência mais alta de autoanticorpos (Grant *et al.*, 2009; Nishii *et al.*, 2011 citados por Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

As reações cruzadas resultam em falsos positivos quando se utilizam, sobretudo, diluições de soro mais baixas (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a; Solano-Gallego *et al.*, 2014). Estas reações são diminuídas quando se utilizam proteínas recombinantes, uma vez que o parasita completo apresenta uma maior variedade de epítomos (Solano-Gallego & Saz, 2013).

Os resultados de testes serológicos podem ainda ser afetados por anticorpos persistentes ou imunossupressão (Martínez *et al.*, 2011).

Assim, o diagnóstico laboratorial de LFel não deve incluir somente métodos serológicos, mas também métodos parasitológicos diretos e/ou moleculares, sobretudo em casos suspeitos com serologia duvidosa ou negativa, de modo a diminuir a subestimação do número de infetados, a transmissão e disseminação do agente (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

8.2.2.1.1 Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

É considerada, pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e pela OMS, o *gold standard* para o diagnóstico serológico da LVZ. Tal deve-se à sua grande sensibilidade (83% - 100%) e especificidade (74% - 100%) na deteção da LCan e LHum (Gradoni & Gramiccia, 2008; Garrido, 2012). Nos gatos, este é o método serológico mais utilizado (Pennisi, 2014).

Apesar desta classificação, vários são os autores que apontam para a necessidade de reavaliar a posição da IFI como *gold standard* para o diagnóstico da doença (Maia *et al.*, 2010; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2010).

Esta técnica baseia-se na ligação dos anticorpos específicos, existentes no soro sanguíneo de um animal, aos antígenos, que se encontram fixos a um suporte sólido, formando complexos antígeno-anticorpo (Maia & Campino, 2008). O título de anticorpos é revelado adicionando-se um conjugado, constituído por anticorpos anti-espécie marcados com um fluorocromo ou

fluoróforo (componente de uma molécula que faz com que esta seja fluorescente). O fluorocromo absorve a energia de um comprimento de onda específico, emitindo posteriormente essa energia sob a forma de outro determinado comprimento de onda maior, avaliado com um microscópio de fluorescência (Gramiccia, 2011; Garrido, 2012). Os anticorpos que não se ligam são eliminados pelas lavagens. Amostras em que os parasitas apresentam uma cor homogênea verde-amarelado fluorescente são consideradas positivas, enquanto que as com coloração castanho-avermelhado são negativas (Maia & Campino, 2008).

Os antígenos mais utilizados são promastigotas completos cultivados *in vitro*, contudo, na infecção natural, o hospedeiro vertebrado reage contra as formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Maia & Campino, 2008). Num estudo realizado por Fernández-Pérez *et al.* (1999) é referido que a reação sobre amastigotas é mais sensível em casos assintomáticos e com baixos títulos de anticorpos específicos (Cardoso, 2004 citado por Garrido, 2012).

Não existe um consenso entre laboratórios acerca do limiar de positividade, título a partir do qual um soro é considerado positivo (Maia & Campino, 2011a).

Em 30 casos clínicos em felinos na Europa, em que se utilizou IFI, o limiar de positividade utilizado variou entre 1:2 e 1:100 e os títulos de anticorpos variaram entre 40 e 5120 (média 640) e, em 5 desses casos, este título foi ≤ 80 , considerado como suspeito no caso dos cães (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a; Pennisi, 2014). Pennisi *et al.* (2012) propuseram um limiar de positividade de 1:80 para o soro felino, tal como nos cães.

Quando se utilizam diluições muito baixas, não se pode excluir a ocorrência de reações cruzadas nesta técnica (Pennisi, 2014).

Apesar de num estudo português em cães a IFI ter revelado uma sensibilidade de 87,5%, esta técnica parece não ser suficientemente sensível a detetar a infecção em gatos (Maia *et al.*, 2008).

Para além das desvantagens já referidas, a necessidade de microscópio de fluorescência e a realização de diluições seriadas, torna a técnica muito trabalhosa e pouco prática para um grande número de amostras. É, apesar do último ponto, utilizada em estudos epidemiológicos, na prática clínica e na monitorização após o tratamento (Maia & Campino, 2008).

8.2.2.1.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O tipo de ELISA mais utilizado para o diagnóstico de leishmaniose é o indireto, no qual se utiliza um antígeno solúvel que está adsorvido a uma superfície de plástico, na qual são colocados os soros ou plasmas sanguíneos suspeitos, e se formam complexos antígeno-anticorpo na presença de anticorpos anti-*Leishmania* (Maia & Campino, 2008).

Estes anticorpos são evidenciados através da adição de um conjugado, que é constituído por um anti-anticorpo ligado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase), seguida da adição de um substrato cromogénico, substância que na presença de uma enzima dá origem a uma outra substância colorida, ocorrendo a reação enzimática e o aparecimento ou mudança de cor, com leitura das densidades óticas (D.O.) num espectrofotómetro (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Garrido, 2012). Esta técnica é indicada para processar um grande número de amostras num curto espaço de tempo, sendo úteis em estudos epidemiológicos (Maia & Campino, 2008).

A sensibilidade e especificidade variam, respetivamente, entre 86% - 99% e 94% - 99,5%, em cães (Garrido, 2012). No entanto, estes parâmetros dependem do antígeno utilizado, referidos anteriormente.

Nos cães, o uso de amastigotas parece ser mais sensível que o de promastigotas (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Os testes com parasita completo são muito sensíveis para infeções clínicas (100%) e subclínicas (94,1% - 100%), mas têm menor especificidade. Testes à base de proteínas recombinantes são mais específicos, mas possuem uma menor sensibilidade para cães infetados doentes ou assintomáticos, dependendo da que se utiliza (Solano-Gallego & Saz, 2013).

Em gatos, Neto *et al.* (2011) realizaram um estudo com parasitas completos, proteínas purificadas e recombinantes, sendo que o primeiro tipo identificou o maior número de possíveis amostras seropositivas, tal como descrito em cães.

Na deteção dos complexos antígeno-anticorpo podem ser utilizados os seguintes conjugados: anticorpos anti-IgG (ELISA-IgG) ou proteína A (ELISA-proteína A) (Lima, Biazzone, Silva, Correa & Luvizotto, 2005). A proteína A é um conjugado polivalente, obtido a partir da bactéria *Staphylococcus aureus*, que se liga à região Fc dos anticorpos de vários mamíferos, constituindo uma das vantagens da técnica que a utiliza, ao contrário do que acontece com o anticorpo anti-IgG, que é espécie específico. No cão, para além da sua reação com todas as subclasses de IgG, também reage parcialmente com IgA e IgM, detetando assim animais na fase aguda da infeção (Lima *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2013).

No estudo de Rodríguez-Cortés *et al.* (2010), em cães, o teste que mostrou um maior potencial na deteção da infeção foi o ELISA que deteta IgG2, em comparação com os que detetam outros isótopos de Ig, IFI, qPCR (sangue e MO) e ensaio de proliferação de linfócitos (LPA).

Ferreira *et al.* (2013) defendem que, apesar do comprovado valor da proteína A, deve-se investir no desenvolvimento de conjugados com anti-IgG específicos para cada espécie, de forma a se alcançarem testes serológicos mais precisos e direcionados.

8.2.2.1.3 Teste de Aglutinação Direta (TAD)

É uma técnica quantitativa que deteta anticorpos no soro, sangue inteiro ou urina do animal suspeito, incubando-o com o antígeno (promastigotas completos, em suspensão ou liofilizado), finalizando com a leitura visual (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Solano-Gallego & Saz, 2013).

Um resultado é positivo quando se observa, à vista desarmada, uma esfera descorada ou um ponto azul pouco definido (fenómeno de aglutinação) no fundo do pocilho, sendo negativo quando se observa um ponto azul totalmente compacto (Solano-Gallego & Saz, 2013).

Esta técnica é económica, simples de realizar, tem elevada sensibilidade (70,6% - 100%) e especificidade (84,9% - 100%), no caso do cão, e, no caso do liofilizado, é útil em locais com temperaturas elevadas. Contudo, necessita de diluições seriadas das amostras, o que se torna trabalhoso para um grande número de amostras, e, ainda, o tempo de incubação de 18h para a leitura de resultados (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego & Saz, 2013).

Nos gatos, a informação acerca do TAD é escassa, no entanto observou-se que esta é menos sensível que a IFI e que o ELISA (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Cardoso *et al.* (2010) obtiveram uma concordância substancial entre os resultados do ELISA-IgG e do TAD num estudo em gatos no norte de Portugal.

8.2.2.1.4 Western Blot (WB)

O WB permite conhecer que frações antigénicas reagem com os anticorpos de animais infetados. Não é utilizado como rotina no diagnóstico da doença, por ser demorado, caro, requerer equipamento e instalações adequadas, assim como pessoal técnico especializado, sendo sobretudo utilizado em investigação (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego & Saz, 2013). No entanto, é indicado para a resolução de casos duvidosos e para a identificação de animais assintomáticos, com baixos títulos de anticorpos. Não foi encontrada até hoje uma relação entre o padrão de bandas e o prognóstico (Maia & Campino, 2008).

A informação acerca do WB nos gatos é escassa, no entanto Marechal (1993) observaram que o WB é mais sensível que a IFI, tal como nos cães (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

8.2.3 Técnicas laboratoriais complementares de diagnóstico

Outros testes laboratoriais que se podem realizar para ajudar no diagnóstico desta doença são: hemograma, perfil bioquímico, electroforese de proteínas séricas e urianálise (Tabela 4).

Algumas das alterações encontradas podem dever-se a outras doenças concomitantes, não sendo, por isso, sinais patognomónicos de LFel (Pennisi, 2010). Ayllón *et al.* (2008)

encontraram uma associação estatística entre a presença de linfocitose e o aumento da enzima alanina aminotransferase (ALT) com seroreatividade à *L. infantum* por IFI.

Nos gatos sintomáticos, as proteínas totais sanguíneas estão aumentadas na maioria dos casos, o que se deve à hiperglobulinemia, sendo que a electroforese das proteínas séricas apresenta, normalmente, uma hipergamaglobulinemia, por vezes com padrão monoclonal, e, mais raramente, hipoalbuminemia (Hervás *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 2002; Pennisi *et al.*, 2004; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Tabela 4. Alterações encontradas nas técnicas laboratoriais complementares de diagnóstico de LFel (Adaptado de Hervás *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 2002; Pennisi *et al.*, 2004; Ayllón *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2009; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Hemograma	Perfil bioquímico	Urianálise
Anemia normocítica normocrômica	Aumento de	proteínas totais
Monocitose		ureia
Neutrofilia		creatinina
Leucopenia		fósforo
Pancitopenia		glucose
Linfopenia, linfocitose, eosinopenia, trombocitopenia	Hipoalbuminemia	Proteinúria
	Aumento das enzimas hepáticas	
		Isostenúria
		Glicosúria

9. Tratamento e Prognóstico

A informação disponível acerca do tratamento de LFel é baseada nos casos clínicos reportados (Anexo III). Até hoje, tem-se realizado um tratamento empírico com os mesmos fármacos utilizados para LCan, apesar da ausência de informações específicas sobre a sua farmacocinética e farmacodinâmica nos gatos (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Os fármacos utilizados em casos clínicos reportados foram: alopurinol (n=14), antimoniato de meglumina (n=4), combinação de fluconazol, itraconazol e metronidazol com espiramicina (n=2), pentamidina (n=1) e cetoconazol (n=1) (Tabela 5 e Tabela 6) (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Foi também realizada excisão cirúrgica de lesões cutâneas em 8 gatos com LFel. Em 3 deles ocorreram recidivas da lesão (Costa-Durão *et al.*, 1994; Leiva *et al.*, 2005; Rüfenacht *et al.*, 2005), em 4 ocorreu a cura clínica na ausência de qualquer tratamento farmacológico anti-*Leishmania* (Verneuil, 2006; Trainor *et al.*, 2010) e um animal, que também não recebeu qualquer tratamento farmacológico, morreu (Poli *et al.*, 2002).

Há casos em que se nota uma melhora clínica com o tratamento, outros tratados cronicamente com alopurinol acabaram por falecer com IRC e há, ainda, os animais que sobrevivem mais 5 anos sem qualquer tratamento (Dalmau *et al.*, 2008).

Gatos com disseminação visceral da infecção necessitam de um tratamento mais longo com alopurinol, pelo menos 6 meses, comparativamente aos animais com apenas lesões cutâneas (Baneth & Solano-Gallego, 2012b).

Tabela 5. Resumo de substâncias ativas já utilizadas no tratamento de LFel (Adaptado de Meireles, 2008; Garrido, 2012; Corrales, 2013; Pennisi, 2014).

Substância ativa	Mecanismo de ação	Toxicidade e efeitos adversos
Análogos das purinas (Ex: Alopurinol)	Inibição das enzimas que realizam a seroconversão das purinas; Diminuição da síntese de ATP; Restrição da síntese proteica.	Baixa toxicidade; não previne a infecção; não elimina o parasita em animais assintomáticos. Nefrolitíase por xantina; xantínúria. Náuseas, vômitos, diarreia e aumento da AST, ALT e FA.
Antimoniais pentavalentes (ex: Antimoniato de meglumina)	Destruição das leishmanias por bloqueio da síntese de ATP e GTP.	Mialgia, vômito, diarreia, dor abdominal, apatia e alterações hepáticas, renais e pancreáticas. Potencial nefrotóxico, Abscessos cutâneos / celulite. Recidivas por resistências ao tratamento.
Diamidinas (ex: Pentamidina)	Desorganização no metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos, alterações nas mitocôndrias, ribossoma e cinetoplasto.	Toxicidade superior e eficácia inferior em relação aos antimoniais pentavalentes. Nefrite, hepatite, dor abdominal, vômitos, hipotensão, síncope e abscessos musculares.
Derivados do Imidazol (ex: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, metronidazol)	Antifúngicos: Ligação aos esteróis das membranas celulares das leishmanias inibindo a sua síntese; Depleção das reservas glucogénicas; Inibição da síntese de ácidos nucleicos.	Eficácia muito reduzida. Cetoconazol: potencial nefrotóxico.

Legenda: ATP: Adenosina Trifosfato; ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina; GTP: Guanosina Trifosfato.

Os fármacos mais utilizados (alopurinol e antimoniato de meglumina) parecem ser bem tolerados na maioria dos casos, mas recomenda-se um controlo da função renal e hepática durante e após o tratamento. O seguimento de alguns casos clínicos reportados confirmou, tal como nos cães, que o tratamento com estes fármacos proporciona cura clínica mas não a

eliminação do parasita (Pennisi, 2013), podendo ocorrer, após o fim do tratamento, a persistência da infecção e a recorrência dos sinais clínicos (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). O prognóstico varia de bom a mau, dependendo de diversos fatores, tal como nos cães. O desenvolvimento de IRC está reportado em animais sujeitos ou não a tratamento e o aparecimento de doença glomerular deve ser vigiado, devido à frequente hiperglobulinemia e à formação e deposição de complexos antígeno-anticorpo nos glomérulos renais (Pennisi, 2014), sendo estas duas situações as principais causas de morte ou eutanásia nesta doença (Pennisi *et al.*, 2013).

Tabela 6. Resumo dos protocolos terapêuticos realizados em 19 casos clínicos de LFel (Adaptado de Pennisi, 2013; Pennisi *et al.*, 2013; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Substâncias ativas	Posologia	Vias de administração	Resultado clínico
Alopurinol	Tratamento a longo prazo 10 -15 mg/kg, BID ou 20-25 mg/kg, SID ou BID	PO	Efetivo na maioria dos casos, mesmo em animais FIV positivos.
Antimoniato de meglumina	5 mg/kg, SID (combinado com o cetoconazol), 3 ciclos de 4 semanas, com intervalo de 10 dias entre cada período. ou 50 mg/kg, SID, 4 semanas ou 375 mg/gato, QUOD, 20 dias	SC SC ou IM IM	Boa resposta clínica, mas não houve seguimento a longo prazo.
Cetoconazol	10 mg/kg, SID, 3 ciclos de 4 semanas, com intervalo de 10 dias entre cada período (combinado com antimoniato de meglumina).	PO	Cura clínica
Fluconazol + Metronidazol e Espiramicina + Itraconazol	5 mg/kg, SID, 2 meses 25 mg/kg, SID, 35 dias 150.000 UI/kg, SID, 35 dias 50 mg/gato, SID, 2 meses	 PO	 Não ocorreu cura clínica

Legenda: BID: 2 vezes ao dia; SID: uma vez ao dia; QUOD: dia sim, dia não; UI: Unidades Internacionais; PO: *per os*; SC: via subcutânea; IM: via intramuscular.

10. Prevenção e Profilaxia

Não existe informação a este nível apenas dirigida a gatos, no entanto, qualquer que seja o animal, o objetivo da prevenção da ocorrência desta doença é a redução da transmissão da infecção, nomeadamente através: do combate ao vetor, do controlo de animais errantes, da

determinação do papel epidemiológico de outros possíveis reservatórios da doença e de um diagnóstico mais precoce e efetivo, sobretudo em áreas endêmicas, adotando, para isso, um conjunto de medidas bem definidas (Meireles, 2008; Pereira da Fonseca, Saraiva-Marques, Basso & Garrido, 2013).

As medidas profiláticas que devem ser aplicadas ao nível do ambiente incluem: reduzir os microhabitats favoráveis aos flebótomos (como pilhas de madeira ou pedras, prédios em ruínas, fendas nas paredes das casas, abrigos de animais ou casca de árvores antigas), realizando também uma desflorestação e reflorestando com buganvílias, limonetes e rícinos que têm um efeito repelente sobre os flebótomos; manter boas condições higiosanitárias; utilizar inseticidas de aplicação ambiental, eletrocutores, aparelhos de ultrassons repelentes de insetos e redes mosquiteiras, de malha fina, nas janelas e portas, pulverizadas com inseticidas à base de piretrinas (compostos naturais) ou piretróides (compostos sintéticos com base nas piretrinas) (Pereira da Fonseca & Santos-Gomes, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011; OMS, 2014b).

As medidas profiláticas que devem ser aplicadas nos gatos domésticos pelos donos são: evitar/impedir o acesso dos animais ao exterior das habitações durante o período de atividade diária dos vetores, ou seja, do anoitecer até ao amanhecer, sobretudo durante a estação de maior atividade dos vetores, e manter o bom estado saúde do animal (Pereira da Fonseca *et al.*, 2013).

Uma grande limitação na prevenção e controlo desta doença nos gatos é que, ao contrário dos cães, não podem utilizar repelentes tópicos à base dos piretróides mais comuns e com ação comprovada sobre os flebótomos, nomeadamente coleiras impregnadas com deltametrina ou unções punctiformes com permetrina (Gramiccia, 2011). Tal deve-se à sua extrema susceptibilidade a estas moléculas, por deficiência da produção da enzima hepática glucuronidase, podendo a sua aplicação levar à morte do animal (Meireles, 2008; Maia & Campino, 2011b).

Em 2011, foi lançada no mercado português uma coleira (Seresto[®]), que possui uma combinação de imidaclopride (10%) e flumetrina (4,5%), com efeito sinérgico entre ambas, para cães e gatos, com efeito repelente e inseticida contra pulgas e carraças, segundo o descrito no resumo das características do medicamento. A flumetrina é, assim, o único piretróide aprovado para gatos, não havendo, contudo, ainda estudos comprovando a sua eficácia sobre os flebótomos (Bayer, 2012).

Também a vacina CaniLeish[®], existente para cães no nosso país, não está disponível para gatos, sendo que o desenvolvimento de uma vacina para esta espécie seria desejável.

A detecção precoce da infecção, a sua vigilância e tratamento da doença são essenciais como medidas de controlo para evitar a expansão da doença a cães, pessoas e a outros possíveis hospedeiros, como os gatos, bloqueando a transmissão aos vetores naturais (Maia & Campino, 2011b).

11. Importância em Saúde Pública

Mundialmente, aproximadamente, 12 milhões de pessoas estão infetadas com *Leishmania* spp. e cerca de 350 milhões estão em risco de adquirir a doença (Baneth & Solano-Gallego, 2012c). A leishmaniose consta da lista das 17 doenças tropicais negligenciadas da OMS e é considerada a terceira mais importante doença transmitida por vetores, a seguir à malária e à filariose linfática (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Vides *et al.*, 2011).

Com base nas manifestações clínicas, as leishmanioses no homem podem classificar-se em: LC, Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), LMC, LV ou *Kala-Azar* na Ásia e Leishmaniose Dérmica Pós-*Kala-Azar* (LDPK) (Anexo IV) (Ashford, 2000; OMS, 2014a).

Estima-se o aparecimento de 1,3 milhões de novos casos por ano, dos quais 0,2 – 0,4 milhões são de LV e 0,7 – 1,3 milhões de LC. Destes 1,3 milhões de novos casos estimados, 20.000 a 30.000 morrem todos os anos (OMS, 2014a).

No nosso país, o primeiro caso de LHum foi descrito em 1910, numa criança de 9 anos, residente em Lisboa, tendo sido esta doença considerada principalmente infantil, no entanto o aparecimento de novos fatores imunossupressores em alguns países da bacia do Mediterrâneo (Portugal, Espanha, França e Itália), destacando-se a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), tem contribuído, não só para o aumento do número de casos de LHum, mas também para uma tendência para a diminuição dos casos nas crianças e para o aumento da infecção em adultos (Campino & Maia, 2010).

Em pessoas imunocompetentes, em Portugal, surgem cerca de 15 a 20 novos casos de LV por ano e o total cumulativo de casos de coinfeção *Leishmania*/VIH até ao final de 2006 era de 223 (Campino & Maia, 2010).

De acordo com a OMS, três medidas primárias devem ser aplicadas para controlar a LHum: controlo dos flebótomos com inseticidas, diagnosticar e tratar os casos em humanos e diagnosticar e eutanasiar cães seropositivos, apesar desta última opção ser muito polémica e discutível (OMS, 2010).

Apesar de não ser evidente a relação direta entre a prevalência de LCan e da LHum, a presença de cães infetados desempenha um papel importante na manutenção da endemia de LVZ, uma vez que o cão é o principal reservatório de *L.infantum* no Mediterrâneo, incluindo

Portugal (Campino & Maia, 2010). Contudo, estudos recentes sugerem que o gato doméstico tem um papel no ciclo de transmissão de *L. infantum*, apesar desse papel não estar ainda bem definido. Mais estudos deverão ser realizados para que tal possa ser esclarecido, nomeadamente através do acompanhamento de gatos infetados ao longo do tempo através de estudos longitudinais (Garrido, 2012).

CAPÍTULO III – DETEÇÃO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP., EM GATOS DA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (IFI E ELISA) E DE UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR) APLICADA A CÉLULAS CONJUNTIVAS E A SANGUE.

1. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

1. Detetar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro sanguíneo de 47 gatos, 32 deles domésticos e 15 de gatil, pelas técnicas serológicas IFI e ELISA;
2. Detetar a presença de ADN de *Leishmania* spp. pela técnica de qPCR, em células conjuntivas (CC) obtidas por zaragatoa conjuntival (ZC) e em sangue, nos 47 gatos acima referidos;
3. Comparar os resultados obtidos pelas técnicas serológicas utilizadas;
4. Comparar os resultados obtidos pela técnica de qPCR em amostras biológicas recolhidas de modo invasivo (sangue) e pouco invasivo (CC);
5. Recolha de informação individualizada, através do preenchimento de um inquérito, com vista à avaliação da associação dos dados recolhidos com a presença de infeção por *Leishmania* spp..

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da área geográfica em que o estudo foi realizado

No período compreendido entre Outubro de 2013 e Julho de 2014, o estudo da infeção por *Leishmania* spp. foi realizado num total de 47 gatos, no distrito de Lisboa, na Área Metropolitana de Lisboa (AML). Esta é constituída por 18 concelhos: Alcochete, Almada, Amadora, Barreiro, Cascais, Lisboa, Loures, Mafra, Moita, Montijo, Odivelas, Oeiras, Palmela, Seixal, Sesimbra, Setúbal, Sintra e Vila Franca de Xira e 207 freguesias no total (Figura 9) (AML, 2014).

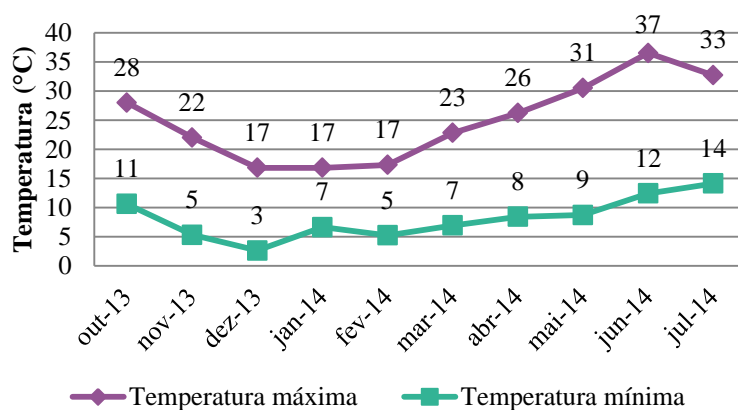
No presente estudo, os animais são provenientes dos seguintes concelhos: Amadora, Cascais, Lisboa, Oeiras, Sintra e Vila Franca de Xira. A AML corresponde a 3,3% do território nacional e regista a maior concentração populacional e económica de Portugal, uma vez que aí residem 2,8 milhões de habitantes, cerca de ¼ da população portuguesa (AML, 2014).

Figura 9. Mapa da AML com marcação dos 18 concelhos que a constituem (Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores, 2008).



Esta área apresenta uma grande variedade morfológica e abundante riqueza natural, com uma costa atlântica com cerca de 150 km e uma frente ribeirinha de cerca de 200 km, possuindo dois grandes estuários: o do Tejo e do Sado (AML, 2014). Está ainda inserida na região mediterrânica, que se caracteriza por um clima com baixa pluviosidade na estação quente (De Freitas, 2010), estando a maior parte da área sujeita a uma precipitação inferior a 800 mm, repartidas por menos de 90 dias durante o ano (Pereira, 2003). A vegetação típica é constituída por, desde que não limitada por fatores de altitude ou secura, bosques e matagais de árvores e arbustos de folhas planas pequenas, coriáceas e persistentes (De Freitas, 2010). A amplitude térmica é menor, comparativamente às regiões interiores do nosso país, devido à ação moderadora do Oceano Atlântico (Ferreira, 2000) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Média das temperaturas máxima e mínima mensais registadas na cidade de Lisboa de Outubro de 2013 a Julho de 2014 (Adaptado de Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2014).



2.2 Caracterização da época de recolha de amostras

As amostras de material biológico foram obtidas entre Outubro de 2013 e Julho de 2014, período este que inclui 4 meses em que o vetor apresenta uma maior atividade (Maio – Outubro). Todos os animais estiveram sujeitos, previamente à recolha das amostras, a, pelo menos, uma época de maior atividade vetorial, com exceção de um animal.

2.3 Caracterização geral da população de gatos em estudo

Este estudo foi realizado numa população de 47 gatos, dos quais 68,1% (32/47) tinham dono e foram assistidos no hospital VetOeiras e 31,9% (15/47) habitavam no Gatil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira. Este gatil alberga cerca de 10 gatos e é composto por uma divisão interior com acesso a uma divisão exterior, à qual os gatos têm acesso a qualquer hora do dia, sendo considerado um habitat misto, podendo os animais dormir ou não na divisão interior. As instalações do gatil encontram-se junto a idênticas instalações de um canil, o Canil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira, com cerca de 60 cães.

2.3.1 Recolha de informação individual

De modo a obter todas as informações que pudessem ser relevantes para o nosso estudo, foi realizado um questionário (Anexo V e Anexo VI).

A anamnese e exame físico foram realizados em todos os animais durante a consulta ou a entrada no gatil e recolhidas as seguintes informações: concelho onde vivem, sexo, idade, raça, tipo de pelagem, origem, habitat, acesso à rua, viagens para possíveis focos endémicos de LCan, coabitação com outros animais, aplicação de ectoparasiticidas, presença de doenças, presença de infeção por FIV ou FeLV e sinais clínicos compatíveis com LFel. Nos animais do Gatil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira, não foi possível obter algumas dessas informações, como a presença de infeção por FIV ou FeLV ou de outras doenças e deslocação anterior para outras áreas endémicas.

Para facilitar a análise dos dados, os animais foram agrupados em classes etárias: jovens (menor ou igual a 1 ano), adultos (maior que 1 ano e até aos 7 anos) e idosos (maior que 7 anos). O tipo de pelagem foi classificado em: curta, média e comprida. As possíveis origens dos gatos da amostra foram definidas como: domésticos ou de gatil.

Foram definidos três tipos de habitat: permanência exclusiva no exterior, permanência no interior da habitação com acesso ao exterior (varanda ou quintal) também designado como habitat misto, e permanência exclusivamente no interior de uma residência.

A presença de retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi anteriormente avaliada utilizando o SNAP® FIV/FeLV Combo Test (IDEXX Laboratories, Espanha) no caso dos animais assistidos no hospital VetOeiras.

No exame físico, foi dada especial atenção à presença de alterações cutâneas (nódulos, pápulas, pústulas, úlceras, crostas, quistos hemorrágicos, alopecia/hipotricose, feridas de difícil cicatrização), alterações oculares (blefarite, conjuntivite, queratite, uveíte, panoftalmite) e alterações sistémicas (insuficiência renal, linfadenomegalia periférica, emagrecimento sem causa aparente).

2.4 Colheita e conservação de amostras biológicas

As amostras apenas foram colhidas em animais que iam ser submetidos a recolha de sangue por decisão do médico veterinário assistente.

Foram colhidos, a cada animal, 2 mL de sangue por venipuntura da jugular, tendo sido realizada anteriormente assepsia com álcool etílico a 70% e, nos casos em que era necessário, a tricotomia do local. De seguida, colocou-se 1 mL de sangue num tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 1 mL num tubo sem anticoagulante e foram ambos colocados a refrigerar a 4°C.

Com uma zaragatoa, fez-se a recolha de células conjuntivais, ao nível da pálpebra inferior de um dos olhos do animal (Figura 10), colocando-se o produto obtido dentro de um tubo de centrifugação com cerca de 1 mL de NaCl 0,9% e conservando-se em refrigeração a 4°C.

Figura 10. Exemplificação da recolha de células conjuntivais ao nível da pálpebra inferior (Original).



O material biológico permaneceu em refrigeração durante, no máximo, 24 horas (h), tendo sido de seguida transportado, com termoacumuladores de frio, para o laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV/ULisboa, onde foi realizado: centrifugação do sangue em tubo seco para obtenção do soro, durante 5 minutos (min.) a 1500 rotações por

minuto (rpm), separado o soro para um tubo de centrifugação e congelado a -20°C; congelação do sangue em EDTA à mesma temperatura e extração de ADN das células conjuntivais e do sangue. Devido ao insuficiente volume de amostra de sangue dos gatos do gatil, não foi realizado a técnica de qPCR neste tipo de amostra.

2.5 Técnicas de diagnóstico e respetivos protocolos utilizados

Foram utilizadas três técnicas de diagnóstico para pesquisar a infeção por *Leishmania* spp., nomeadamente: dois testes serológicos para pesquisa de anticorpos - ELISA e IFI - e uma técnica de biologia molecular para deteção de ADN do parasita - qPCR.

2.5.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de ELISA

Utilizou-se uma técnica de ELISA indireta (LEISCAN® *Leishmania* ELISA Test, ESTEVE, Portugal), para deteção e medição semi-quantitativa de IgG contra *Leishmania* spp. em soro ou plasma (Figura 11).

Figura 11. Constituição do kit LEISCAN® *Leishmania* ELISA Test (Original).



O procedimento de ensaio seguido foi de acordo com as indicações do fabricante (Anexo VII). Resumidamente e de acordo com o fabricante, este teste utiliza como antígeno proteínas purificadas de *Leishmania* spp., selecionadas pela sua elevada sensibilidade, que se encontram adsorvidas em pocilhos, nos quais se colocam os soros a avaliar. De seguida, adiciona-se o conjugado: proteína A ligada à enzima peroxidase e se forem formados complexos antígeno-anticorpo, o conjugado liga-se ao anticorpo e ao se adicionar o substrato, observa-se mudança de cor.

A leitura das D.O. é realizada por um espectrofotómetro (SpectraMax® 340PC384, Molecular Devices), utilizando um filtro com um comprimento de onda de 450 nanómetros (nm).

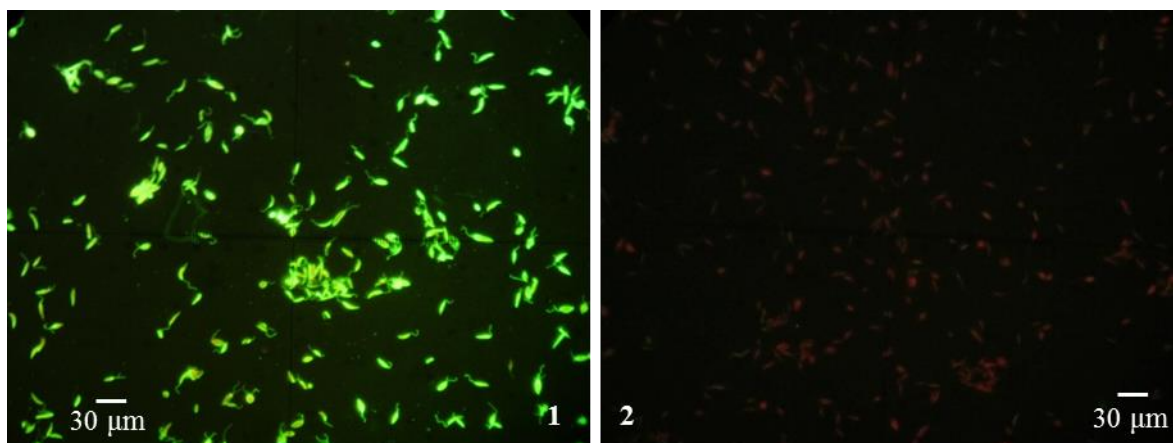
2.5.2 Pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* pela técnica de IFI

Nesta técnica, foi utilizado como controlo positivo um soro de gato com um título de anticorpos de 1:320, proveniente da seroteca do laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV/ULisboa. Como controlo negativo foi utilizado um soro de gato sem presença de anticorpos anti-*L. infantum*.

Para a realização da IFI, utilizou-se o kit *Leishmania* Spot IFI® (Laboratório BioMérieux, Marcy L'Etoile, França). Este contém o antígeno, promastigotas completos, fixo a um suporte sólido. Foram seguidas as indicações do fabricante com as devidas adaptações (Anexo VIII). Utilizou-se um conjugado específico para gatos, composto por anticorpos anti-IgG de gato marcados com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (MegaScreen FLUO VET®, MegaCor Diagnostik GmbH). O limiar de positividade considerado foi de 1:80, como previamente estabelecido pelo fabricante.

As amostras são classificadas como positivas se for emitido um evidente sinal de fluorescência verde-amarelada, delimitando o citoplasma e/ou a membrana dos promastigostas, enquanto os resultados negativos exibem uma coloração castanho-avermelhado (Maia & Campino, 2008) (Figura 12).

Figura 12. Aspeto de amostras positiva (1) e negativa (2) para *L. infantum* pela técnica de IFI, na diluição 1:80 (Gentilmente cedidas pela Dra. Lúcia Gomes).



2.5.3 Deteção de ADN de *Leishmania* spp. através da técnica de qPCR

As amostras foram processadas pelo Mestre Marcos Santos, bolseiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), nos laboratórios de Parasitologia e Doenças Parasitárias e de Virologia da FMV/ULisboa.

2.5.3.1 Método de extração de ADN

Para a extração de ADN das células conjuntivais e do sangue utilizou-se o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit® (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante com algumas adaptações (Anexo IX).

2.5.3.2 Técnica de qPCR

A técnica de qPCR foi realizada com a sonda *TaqMan*® (Applied Biosystems) por ser bastante específica, uma vez que a emissão de fluorescência resulta exclusivamente da hidrólise desta sonda (Mortarino, Franceschi, Mancianti, Bazzocchi, Genchi & Bandi, 2004).

Esta sonda é um oligonucleótido marcado com um fluorocromo (*reporter*) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3', o qual absorve o sinal fluorescente gerado pelo fluorocromo quando ambos se encontram próximos, ou seja, enquanto não se verifica a hidrólise da sonda. O protocolo térmico de amplificação garante a ligação da sonda fluorescente à sequência alvo antes da ligação dos *primers* e o início da síntese pela *TaqADN* polimerase. Durante este processo, a atividade de exonuclease 5'-3' da *TaqADN* polimerase digere a sonda, induzindo o consequente afastamento entre o *reporter* e o *quencher*, levando à emissão de fluorescência que é captada pelo equipamento. A intensidade do sinal acumulada no final de cada ciclo é proporcional à quantidade do produto final amplificado (Mortarino *et al.*, 2004; Garrido, 2012). A amplificação é seguida visualmente em gráficos (fluorescência *versus* números de ciclos) permitindo monitorizar, em tempo real, a cinética da reação de amplificação (Garrido, 2012).

A reação de amplificação foi realizada num volume total de 20 µL, para cada amostra, contendo: 2 µL de água estéril Milli-Q (Millipore®), 10 µL da *TaqMan*® Gene Expression Master Mix™ (Applied Biosystems), 2 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2 µL da sonda *TaqMan*® e 2 µL de amostra a testar. Cada *primer* encontrava-se a uma concentração de 300 nanomoles (nM) e a sonda a 250 nM.

O alvo da amplificação é um fragmento de 124 pares de bases (pb) da região constante de um minicírculo de kADN de *Leishmania* spp.. Os *primers* e a sonda *TaqMan*® foram desenhados usando o programa *Primer Designing Tool* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), iguais aos utilizados por Helhazar *et al.* (2013), obtendo-se as seguintes sequências:

Sequência nucleótida	
<i>primer forward</i>	5'- AGG TGT CGT AAA TTC TGG AA - 3'
<i>primer reverse</i>	5'- CGG GAT TTC TGC ACC ATT - 3'
sonda <i>TaqMan</i> ®	[FAM] 5'- AAT TCC AAA CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG - 3' [TAMRA]

Na detecção de ADN de *Leishmania* spp. por qPCR utilizou-se o termociclador Real Time 7300 Applied Biosystems®. As etapas no termociclador encontram-se descritas na Tabela 7, após as quais se realizou a leitura e registo de dados.

Tabela 7. Fases da amplificação da técnica de qPCR.

Nº de Ciclos	Função	Temperatura (°C)	Duração
1	Pré-desnaturação	95	10 min.
45	Desnaturação	95	15 segundos
	Annealing e Extensão	60	1 min.

Como controlo positivo foi utilizado um plasmídeo recombinante pGEM® T-easy (Promega, Portugal), que incluía a região alvo a amplificar. Como controlo negativo recorreu-se ao uso de água estéril (Millipore®). O ensaio foi validado, uma vez que se obteve amplificação do controlo positivo e no controlo negativo não se observou amplificação.

O valor de Ct (*Cycle threshold*) é calculado para cada amostra e corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente ultrapasse o limiar de detecção (Quaresma *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2012), expressando o ciclo a partir do qual a quantidade basal de fluorescência sofre um aumento exponencial (Kubista *et al.*, 2006 citado por Garrido, 2012). O limiar de detecção é definido automaticamente pelo *software*, sendo que o utilizado no presente trabalho foi o 7300 System SDS Software V1.4® (Applied Biosystems).

Para estimar a carga parasitária realizaram-se diluições seriadas de base 10 do plasmídeo recombinante, a partir de uma determinada concentração (Tabela 8). A conversão das concentrações em número de cópias do alvo por µL é obtida, com base em Dhanasekaran, Doherty & Kenneth & Trials Study Group (2010), através da fórmula:

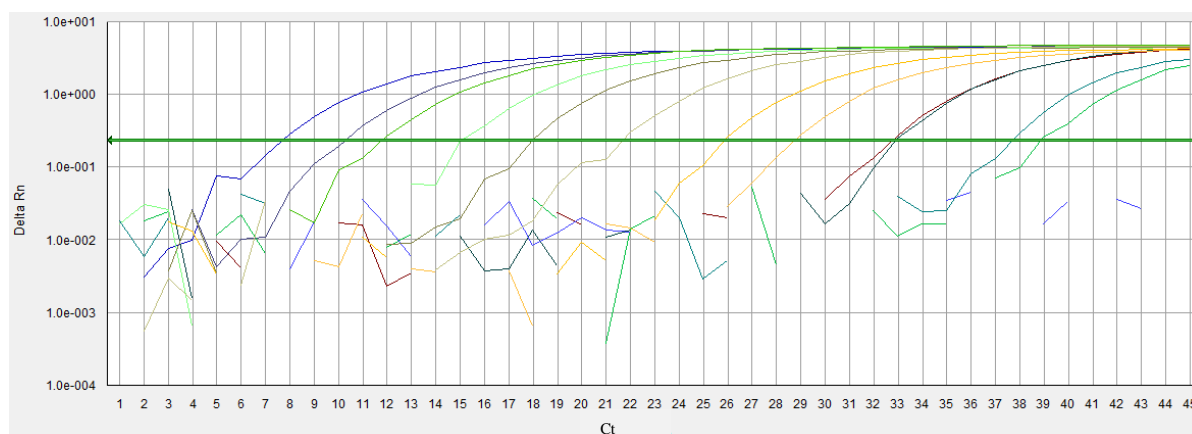
$$N^{\circ} \text{ de cópias}/\mu\text{L} = \frac{[\text{DNA}](\text{g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23} (\text{moléculas}/\text{mole})}{[\text{Comprimento do fragmento}] \times 660 \text{ daltons}}$$

Após cada diluição ter sido testada em triplicado e sido feita a leitura pelo aparelho (Figura 13), a média dos valores de Ct foram representados graficamente em função do logaritmo do número de cópias do alvo por µL, possibilitando a obtenção do número de cópias por amostra. Assim, obteve-se uma reta de regressão linear, que neste caso possui um declive de -3,29 e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,995, correspondendo a uma eficiência da reação (E) de 101,3% (Gráfico 3). A sensibilidade da técnica é de, pelo menos, 16 cópias de alvo, confirmada pelas diluições seriadas de plasmídeo.

Tabela 8. Diluições seriadas do plasmídeo recombinante e os respectivos valores médios de Ct.

[Plasmídeo]	Nº cópias/ μL	Log (Nº cópias/ μL)	Valor de Ct médio
219 ng/ μL	$1,6 \times 10^{12}$	-	-
21,9 ng/ μL	$1,6 \times 10^{11}$	11,2	7,96
2,19 ng/ μL	$1,6 \times 10^{10}$	10,2	10,53
219 pg/ μL	$1,6 \times 10^9$	9,2	11,78
21,9 pg/ μL	$1,6 \times 10^8$	8,2	15,46
2,19 pg/ μL	$1,6 \times 10^7$	7,2	17,99
219 fg/ μL	$1,6 \times 10^6$	6,2	22,23
21,9 fg/ μL	$1,6 \times 10^5$	5,2	25,30
2,19 fg/ μL	$1,6 \times 10^4$	4,2	29,15
219 ag/ μL	$1,6 \times 10^3$	3,2	32,23
21,9 ag/ μL	$1,6 \times 10^2$	2,2	34,08
2,19 ag/ μL	$1,6 \times 10^1$	1,2	38,17

Figura 13. Exemplificação das curvas de amplificação nas diluições seriadas do plasmídeo recombinante e respectivos valores de Ct, obtido por qPCR (Original).

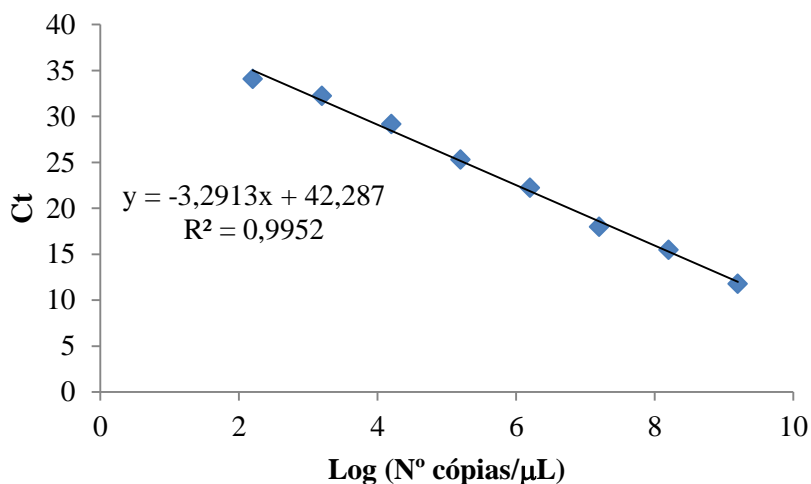


Legenda: Delta Rn: Magnitude do sinal de fluorescência; Ct: *Cycle threshold*. A linha horizontal verde indica o limiar de detecção. Abaixo do limiar de detecção encontram-se as amostras negativas.

A técnica de qPCR foi realizada em triplicado para cada amostra, a fim de diminuir a percentagem de erro, quer por possíveis quantidades reduzidas de ADN, que implicariam menor probabilidade da amostra conter o ADN alvo, quer por contaminações externas.

O cálculo do número de parasitas por amostra de CC ou por mL de amostra de sangue foi realizado com base nos estudos de Noyes *et al.* (1998) e Nicolas *et al.* (2002).

Gráfico 3. Reta padrão obtida pelas diluições seriadas do plasmídeo recombinante.



Legenda: Ct: *Cycle Threshold*; R^2 : coeficiente de determinação.

2.6 Análise estatística

Para análise estatística dos dados e a apresentação dos resultados foram utilizados dois programas: Excel 2010 do Microsoft Office[®] (Microsoft Corporation, EUA) e o programa R, versão 3.1.1[®] (2014) (R Core Team, Viena, Áustria). Foram também utilizados métodos de estatística descritiva e como medidas estatísticas usou-se frequências absolutas e relativas para a apresentação das variáveis estudadas em gráficos, tabelas e medidas numéricas de síntese.

As prevalências apresentadas são aparentes, uma vez que não se utilizou um *gold standard*. Para o cálculo dos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de uma prevalência aparente (P), numa amostra com n animais, utiliza-se a seguinte fórmula, baseada na aproximação da distribuição normal à distribuição binominal (Thrusfield, 2007):

$$P \pm 1,96\sqrt{(P(1 - P))/n}$$

Para testar associações estatísticas entre variáveis nominais é normalmente utilizado o Teste de independência do Qui-Quadrado (χ^2) ou de Pearson, no entanto este não é válido em amostras muito pequenas, ou seja, quando, nas tabelas de contingência, o valor esperado numa célula possa ser 0 ou quando mais de 25% das células tem um valor esperado inferior a 5. Nestas situações, utiliza-se o Teste Exato de Fisher, que não tem essas restrições (De Oliveira, 2009). Foi assumido um nível de significância (p) inferior a 0,05 ($p < 0,05$), para um intervalo de confiança (IC) de 95%, rejeitando-se a hipótese nula (não existe associação entre as duas variáveis) (Petrie & Watson, 2006).

Odds-ratio (razão de verossimilhança) mede o grau de associação das variáveis, enquanto o teste diz apenas se há ou não associação (Thrusfield, 2007).

O coeficiente *Kappa* de Cohen (*k*) foi também calculado. É, muitas vezes, utilizado para avaliar a concordância entre dois métodos de diagnóstico na ausência de um *gold standard*, por não se poder aceder à validade dos testes (sensibilidade e especificidade) (Thrusfield, 2007).

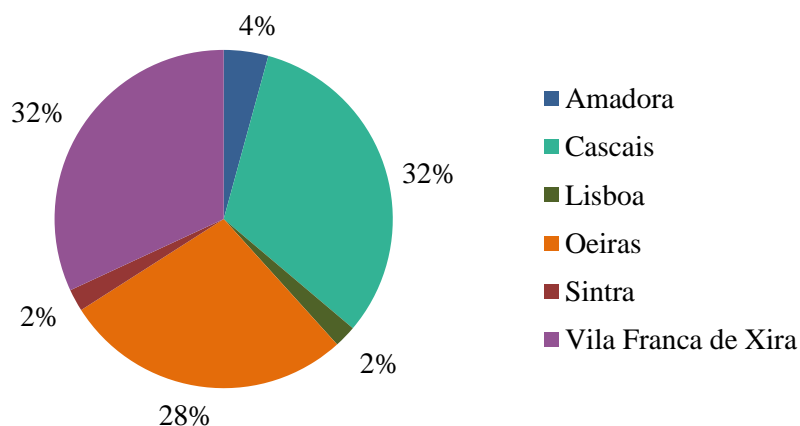
3. Resultados

3.1 Caracterização dos animais da amostra

3.1.1 Concelho

Cerca de um terço dos gatos da amostra habitava nos concelhos de Vila Franca de Xira e Cascais (15 animais em cada um deles), 13 animais em Oeiras, 2 animais na Amadora, um em Sintra e um em Lisboa (Gráfico 4).

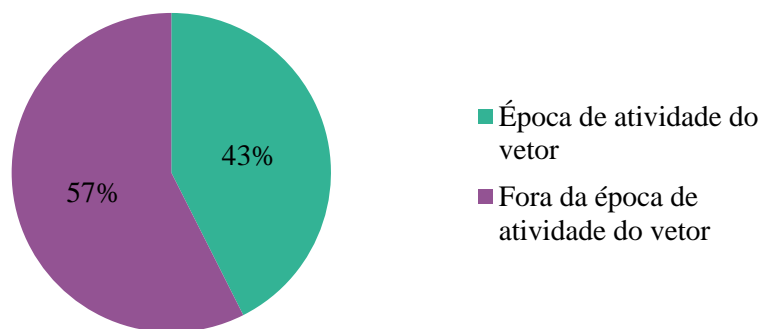
Gráfico 4. Distribuição dos gatos por concelho (n=47).



3.1.2 Época de maior atividade vetorial

Durante a época de maior atividade do vetor foram feitas 27 recolhas de amostras biológicas, enquanto 20 foram realizadas fora dessa mesma época (Gráfico 5).

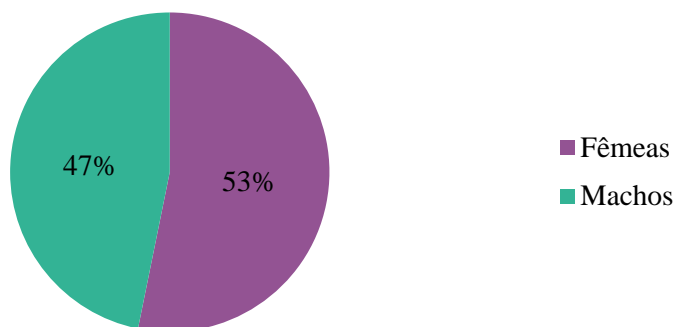
Gráfico 5. Distribuição dos gatos por época de recolha das amostras (n=47).



3.1.3 Sexo

O número de machos e fêmeas é bastante semelhante entre si, respetivamente, 22 e 25 animais (Gráfico 6). No sexo feminino, 12% (3/25) eram fêmeas ovariectomizadas, enquanto 88% (22/25) não estavam esterilizadas. No sexo masculino, 45,5% (10/22) estavam orquiectomizados, enquanto 54,5% (12/22) eram inteiros.

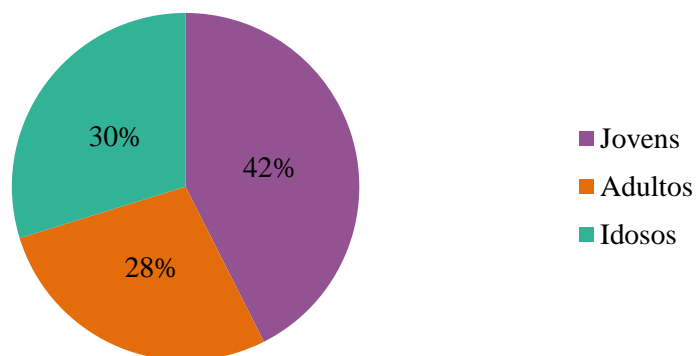
Gráfico 6. Distribuição dos gatos por sexo (n=47).



3.1.4 Idade

Os animais tinham entre 5 meses e 18 anos, sendo a média de, aproximadamente, 5 anos. Na amostra total, os jovens correspondiam a 20 animais, os adultos a 13 e os idosos a 14 gatos (Gráfico 7). No total da amostra, 8,5% (4/47) dos animais tinham uma idade inferior ou igual a 6 meses.

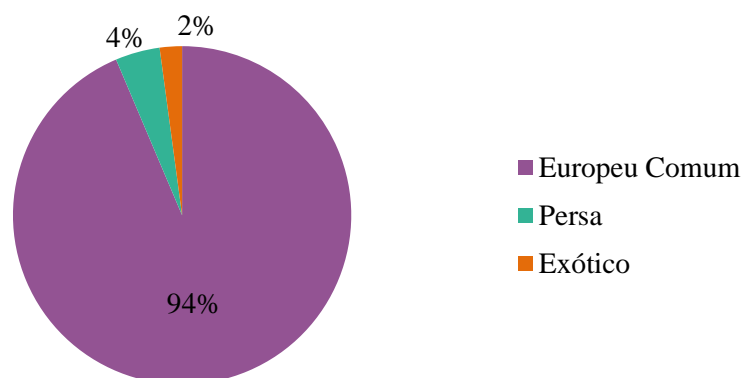
Gráfico 7. Distribuição dos gatos por classes etárias (n=47).



3.1.5 Raça

Relativamente à raça, 44 gatos eram Europeu Comum (EC), 2 eram de raça Persa e um da raça Exótico (Gráfico 8).

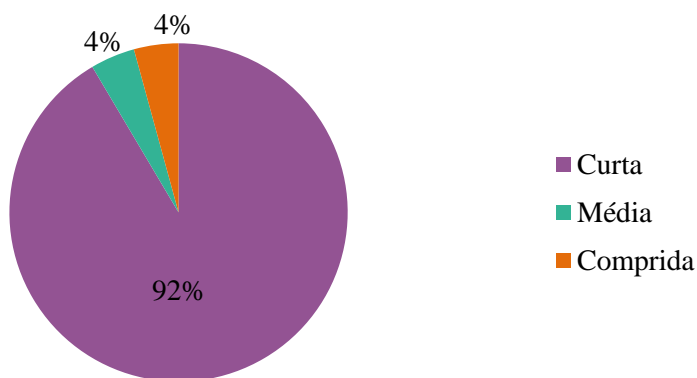
Gráfico 8. Distribuição dos gatos por raça (n=47).



3.1.6 Tipo de pelagem

A pelagem curta estava presente em 43 animais e as pelagens média e comprida em 2 gatos cada (Gráfico 9). A pelagem curta corresponde a todos os EC, com exceção de um deles, a média corresponde ao Exótico e a um EC e a comprida aos dois Persas.

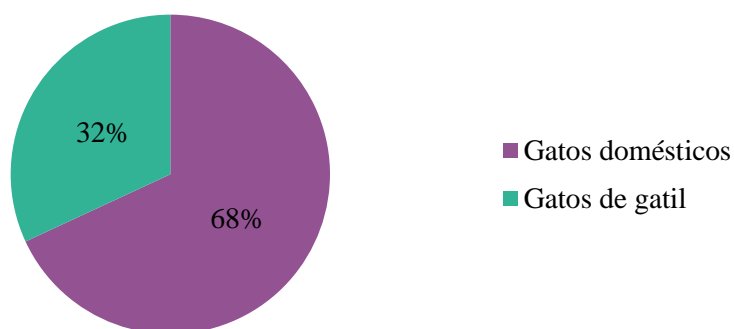
Gráfico 9. Distribuição dos gatos por tipo de pelagem (n=47).



3.1.7 Origem

No total da amostra, 32 animais eram domésticos e 15 habitavam no gatil referido (Gráfico 10). Os gatos do gatil estavam, no mínimo, há 7 dias e, no máximo, há 1 ano no gatil quando as amostras foram recolhidas.

Gráfico 10. Distribuição dos gatos de acordo com a sua origem (n=47).

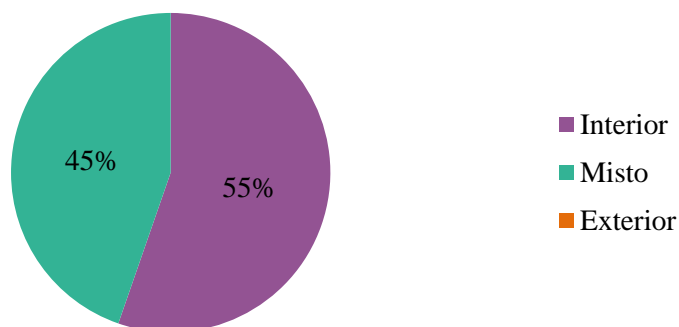


3.1.8 Habitat

Nenhum animal se encontrava exclusivamente no exterior. Exclusivamente no interior das habitações permaneciam 26 animais. Todos os gatos do gatil (n=15) tinham um habitat misto. Todos os gatos domésticos com habitat misto (n= 6) tinham acesso livre ao exterior sempre que quisessem, mas dormiam dentro de casa (Gráfico 11).

Um animal viajava para focos endémicos de LCan, nomeadamente, Algarve, no período de férias de verão.

Gráfico 11. Distribuição dos gatos por tipo de habitat (n=47).



3.1.9 Coabitação com outros animais

A representação da distribuição dos animais da amostra relativamente à coabitação com outros animais encontra-se na Tabela 9.

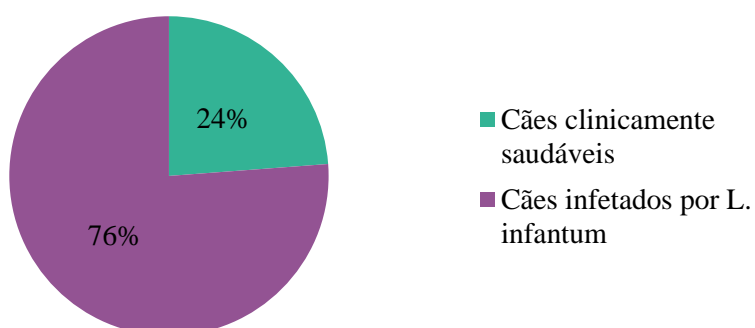
Tabela 9. Frequências absolutas e relativas da coabitação dos gatos da amostra com outros animais (n=47).

	FA	≈ FR (%)
Coabitação com gatos	41	87,2
Coabitação com cães	21	44,7
Não coabitação com animais	6	12,8

Legenda: FA: frequência absoluta; ≈ FR (%): frequência relativa aproximada

Dos animais que coabitavam com cães (n=21), 5 deles conviviam com cães clinicamente saudáveis e 16 com cães infetados por *L. infantum* (Gráfico 12).

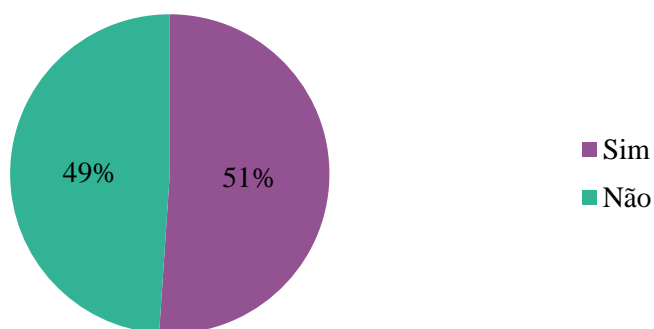
Gráfico 12. Distribuição dos gatos por coabitação com cães clinicamente saudáveis ou infetados por *L. infantum* (n=21).



3.1.10 Profilaxia contra ectoparasitas

Na amostra total, os ectoparasiticidas eram administrados em 24 animais (Gráfico 13). Contudo, as indicações do período correto de administração nem sempre eram cumpridas. As substâncias ativas utilizadas foram: Lufenuron (Program 40[®]), Imidaclopride (Advantage[®]) e Fipronil com (S)–Metopropeno (Frontline Combo[®]).

Gráfico 13. Distribuição dos gatos por realização de profilaxia contra ectoparasitas (n=47).



3.1.11 Presença de doenças

No total da amostra, 14 gatos apresentavam uma ou mais doenças (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos gatos por presença de doença (n=14).

Doença	Número de animais
Panleucopénia felina	1
Pneumonia bacteriana	1
Dermatite nasal e FIV	1
Hemoplasmose (<i>Mycoplasma haemofelis</i>)	1
IRC	4
Insuficiência das válvulas mitral e tricúspide	1
Lipidose hepática	1
Linfoma renal e FeLV	2
Linfoma intestinal	1
Massa tumoral na artéria pulmonar	1
Hipertiroidismo	1
Policitemia vera	1
Doença broncopulmonar	1

Legenda: FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina; IRC: Insuficiência Renal Crónica; FeLV: Vírus da Leucemia Felina.

3.1.11.1 Presença de retrovírus (FIV e/ou FeLV)

No total da amostra, 51,1% (24/47) dos animais não foram anteriormente testados. Nos animais testados (23/47), encontravam-se 4,3% (1/23) positivos para a presença de anticorpos contra o FIV e 8,7% (2/23) para a presença de antígeno do FeLV, não havendo nenhum

animal positivo a ambos. No total da amostra, os animais FIV positivos correspondiam a 2,1% (1/47) e os FeLV positivos a 4,3% (2/47) (Tabela 10).

3.1.12 Presença de sinais clínicos compatíveis com LFel

Do total dos animais da amostra, 12,8% (6/47) tinham, pelo menos, um sinal compatível com LFel. A distribuição dos sinais clínicos foi a seguinte: feridas de difícil cicatrização (n=1; 2,1%), gengivite (n=1; 2,1%) e IRC (n=4; 8,5%).

3.2 Resultados obtidos pela técnica de ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

Todos os soros (n=47) foram sujeitos a esta técnica e todos obtiveram um resultado negativo (seroprevalência aparente = 0%). No Anexo X encontram-se descritas as razões obtidas para cada amostra e a tabela fornecida pelo fabricante do kit para a interpretação das razões obtidas.

3.3 Resultados obtidos pela técnica de IFI na pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum*

Todos os soros (n=47) revelaram um resultado negativo (seroprevalência aparente = 0%).

3.4 Resultados obtidos pela técnica de qPCR, em CC e em sangue, na pesquisa de ADN de *Leishmania* spp.

Os resultados obtidos por esta técnica encontram-se na Tabela 11.

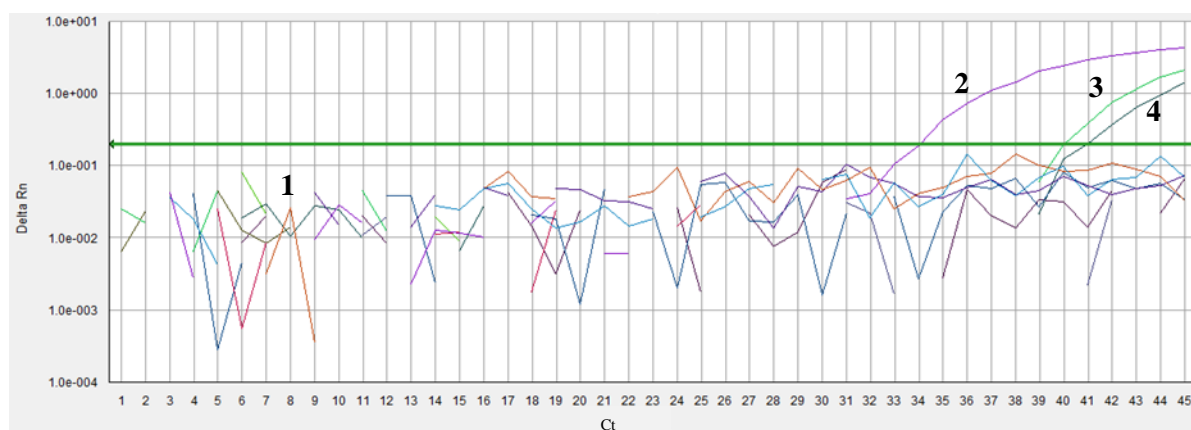
Tabela 11. Distribuição dos resultados positivos obtidos pela técnica de qPCR nas duas amostras biológicas.

Positivos em CC	31,9% (15/47)
Positivos em sangue	25,0% (8/32)
Positivos em CC e em sangue	9,4% (3/32)

Para cada amostra, obtivemos uma prevalência aparente de, aproximadamente, 32% em CC (IC 95% = [18,7% - 45,3%]) e de 25% no sangue (IC 95% = [10% - 40%]). De notar que 15 animais, provenientes de gatil, não foram testados utilizando a amostra sanguínea.

A média dos valores de Ct obtidos pela técnica de qPCR em CC variaram entre 41,07 e 38,02 (média: 39,31) e no sangue variaram entre 40,17 e 38,33 (média: 39,38) (Gráfico 14).

Gráfico 14. Exemplo da amplificação de duas amostras positivas para *Leishmania* spp. (3 e 4), do controle positivo (2) e ausência de amplificação de outras amostras (1) pela técnica de qPCR.



Legenda: Delta Rn: Magnitude do sinal de fluorescência; Ct: *Cycle threshold*. A linha horizontal a verde indica o limiar abaixo do qual se encontram as amostras negativas.

O número de cópias da sequência alvo na amostra, correspondente a cada Ct, encontra-se no Anexo XI e no Anexo XII, e variou entre 140 e 1187 (média: 547) nas amostras de CC e entre 880 e 3186 (média: 1652) no sangue. O número de parasitas nas amostras de CC variou entre 0,01 e 0,12, com uma média de 0,05 *Leishmania*/amostra. O número de parasitas por mL de sangue variou entre 0,4 e 1,6 (média, aproximadamente, de 1 *L.*/mL).

Na Tabela 12, encontram-se os resultados de todas as técnicas utilizadas neste estudo.

Tabela 12. Resultados das amostras analisadas por todas as técnicas utilizadas (IFI, ELISA, qPCR em CC e qPCR em sangue).

Gato	ELISA	IFI	qPCR CC	qPCR Sangue
1	N	N	P	N
2	N	N	P	N
3	N	N	N	N
4	N	N	P	N
5	N	N	N	P
6	N	N	N	P
7	N	N	N	N
8	N	N	N	P
9	N	N	N	N
10	N	N	N	N
11	N	N	P	P
12	N	N	N	P
13	N	N	N	N
14	N	N	P	P
15	N	N	N	N

Tabela 13 (continuação). Resultados das amostras analisadas por todas as técnicas utilizadas (IFI, ELISA, qPCR em CC e qPCR em sangue).

Gato	ELISA	IFI	qPCR CC	qPCR Sangue
16	N	N	N	N
17	N	N	N	N
18	N	N	N	N
19	N	N	N	N
20	N	N	N	P
21	N	N	N	N
22	N	N	P	P
23	N	N	P	N
25	N	N	N	N
26	N	N	N	N
27	N	N	N	N
28	N	N	N	N
29	N	N	N	N
30	N	N	N	N
31	N	N	P	N
32	N	N	N	N
34	N	N	P	N
35	N	N	N	NA
36	N	N	P	NA
37	N	N	N	NA
38	N	N	P	NA
39	N	N	N	NA
40	N	N	P	NA
41	N	N	N	NA
43	N	N	N	NA
44	N	N	P	NA
45	N	N	N	NA
46	N	N	P	NA
47	N	N	N	NA
48	N	N	N	NA
49	N	N	P	NA
50	N	N	N	NA

Legenda: CC: células conjuntivais; N: negativo; NA: não avaliado; P: positivo.

3.5 Resultados da análise estatística

Uma vez que os resultados obtidos pelas técnicas serológicas foram negativos, não foi possível retirar qualquer conclusão a nível estatístico com base nestas, considerando-se somente os resultados obtidos pelas técnicas moleculares para a avaliação da influência de determinados fatores mencionados no inquérito.

Neste contexto, foi avaliada a possível associação entre os resultados positivos na qPCR em CC e em sangue com os seguintes fatores: concelho, sexo, idade, raça, tipo de pelagem, origem, habitat, coabitação com outros animais, profilaxia contra ectoparasitas, presença de doenças, presença de retrovírus (FIV e FeLV) e sinais clínicos compatíveis com LFel (Tabela 14). Nos Anexo XIII e Anexo XV encontram-se as tabelas com uma descrição mais pormenorizada destes resultados.

Através dos resultados apresentados na tabela referida acima, conclui-se que não existe qualquer associação estatisticamente significativa entre a infecção por *Leishmania* spp. em gatos, pesquisada pela técnica de qPCR, e determinados fatores referidos no inquérito na amostra de animais estudada. No Anexo XVI, encontra-se uma tabela com a descrição de cada animal positivo.

Foi obtido ainda o coeficiente *Kappa* de Cohen (*k*) entre os resultados da técnica de qPCR em CC e em sangue (n=32). O valor deste coeficiente foi de 0,12, o que indica uma concordância muito fraca entre as duas técnicas, segundo Landis & Koch (1977) (Petrie & Watson, 1999).

Tabela 14. Avaliação da associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos compatíveis com LFel com a infecção por *Leishmania* spp., segundo os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC e sangue.

	CC	Sangue
	<i>p</i>	<i>p</i>
Concelho	0,48	1
Época de maior atividade do vetor	0,76	0,40
Sexo	0,55	0,25
Idade	0,59	0,30
Raça	0,08	0,58
Tipo de pelagem	0,09	0,56
Origem	0,51	*
Habitat	1	1
Coabitação com cães infetados por <i>L. infantum</i>	0,32	1
Coabitação com cães clinicamente saudáveis	1	0,09
Profilaxia com ectoparasiticidas	0,53	1
Presença de doença	1	0,70
FIV	1	1
FeLV	0,08	0,40
Sinais clínicos compatíveis com LFel	1	0,30

Legenda: *: esta técnica não foi realizada nos animais do gatil.

4. Discussão

A LVZ é uma doença endêmica em várias regiões do globo, afetando animais e humanos de forma igualmente grave, tratando-se de um sério problema quer a nível de Saúde Animal quer de Saúde Pública, revelando a necessidade de controlar esta doença segundo o recente conceito de *One Health*.

Tal como no cão e no Homem, nos últimos anos, um crescente número de casos de LFel por *L. infantum*, zimodemo MON-1, tem sido reportado, sobretudo em áreas endêmicas de LCan e LHum ou em felinos que viajaram ou foram importados dessas mesmas regiões (Pennisi *et al.*, 2013).

No nosso estudo, foram utilizados três métodos para o diagnóstico da infeção por *Leishmania* spp., dois serológicos (ELISA e IFI) e um molecular (qPCR), este em dois tipos de amostra diferentes (CC e sangue).

Para a realização da técnica de ELISA, recorreu-se ao kit LEISCAN[®] *Leishmania* ELISA Test, que utiliza como conjugado a proteína A. Os resultados obtidos por esta técnica foram negativos em todas as amostras recolhidas para o nosso estudo. Ao que sabemos, não existem, até à data, estudos publicados em Portugal nos quais esta técnica tenha sido utilizada em gatos.

A utilização da proteína A nesta técnica confere-lhe uma maior sensibilidade e especificidade comparativamente ao anticorpo anti-IgG, uma vez que esta proteína tem afinidade para a região Fc das IgG, possibilitando a deteção em várias espécies dos anticorpos específicos (Nasereddin *et al.*, 2008).

Cardoso *et al.* (2010) realizaram um estudo em gatos, em Portugal, utilizando a técnica de ELISA, no entanto utilizaram como conjugado anti-IgG de gato, e a prevalência obtida foi de 2,8% (9/316).

Em Espanha (Barcelona, Tarragona e ilha de Maiorca), Solano-Gallego *et al.* (2007) realizaram as técnicas ELISA-IgG e ELISA-proteína A em soro de gatos, ambas utilizando a enzima peroxidase, e as seroprevalências foram 5,25% e 6,29%, respetivamente. No entanto, Costa (2008), no Brasil, em gatos, obteve uma maior positividade com o ELISA-IgG (11,5%) comparativamente com o ELISA-proteína A (4,5%) e a concordância entre as técnicas foi considerada fraca. Os resultados discordantes entre este autor e Solano-Gallego *et al.* (2007) estão relacionados com o desenvolvimento da metodologia utilizada e com diferenças epidemiológicas (Garrido, 2012).

Na técnica de IFI, utilizou-se o limiar de positividade 1:80, como indicado pelo fabricante para os cães e como defendido por Pennisi *et al.* (2012) para os gatos. Os resultados obtidos por esta técnica foram também negativos em todas as amostras recolhidas. Tal está de acordo

com outros estudos epidemiológicos realizados em Portugal, em que as seroprevalências de infecção por *Leishmania* spp. em gatos foram de: 1,03% (1/97) (Vaz *et al.*, 2005), 0% (0/75 e 0/70) (Faria, 2008; Rosa, 2009), 0,6% (1/180) (Duarte *et al.*, 2010) e 1,3% (1/76) (Maia *et al.*, 2010). No entanto, Maia *et al.* (2008), Garrido (2012) e Marques *et al.* (2013) obtiveram seroprevalências mais altas: 20% (4/20), 12,5% (5/40) e 17,95% (7/39), respetivamente, na AML.

Nos cães, Gradoni *et al.* (2004) estabeleceram que em áreas endémicas, o limiar de positividade é $\geq 1:160$, sendo considerados como títulos *borderline* (suspeitos para leishmaniose) entre 1:40 e 1:80 e negativos com título $< 1:40$.

Nos gatos, o limiar de positividade utilizado não se encontra definido, sendo que em 30 casos clínicos reportados na Europa, variou entre 1:2 e 1:100 e os títulos de anticorpos variaram entre 40 e 5120 (média 640). Em 5 desses casos, o título de anticorpos foi ≤ 80 , considerado como suspeito nos cães (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a; Pennisi, 2014). A maioria dos autores utiliza um limiar de positividade para os gatos de 1:40 ou 1:80.

Pennisi *et al.* (2012) afirmam que o limiar de positividade para a infecção felina por *Leishmania* spp. pode ser 1:80, tal como se utiliza nos cães. No entanto, na AML, Duarte *et al.* (2009), utilizaram 1:40 no seu rastreio em gatos de rua e Maia *et al.* (2010) obtiveram apenas um gato positivo em 76 animais, com um título 1:128.

Spada *et al.* (2013), numa área não endémica no norte de Itália, em 59 animais seroreativos, 38 tiveram um título de anticorpos de 1:40, 15 de 1:80 e 6 de 1:160, ou seja, um maior número de seroreativos (64,4%) foi obtido com a menor diluição normalmente utilizada, 1:40. É necessário ter em atenção que quando se utilizam diluições muito baixas na técnica de IFI, não se pode excluir a ocorrência de reações cruzadas (Pennisi, 2014), daí que se evite por vezes a sua utilização.

O facto de esta técnica não estar estandardizada para gatos, não existindo um limiar de positividade universalmente aceite, leva a que se utilize, frequentemente, os que se encontram validados para os cães (Spada *et al.*, 2013).

De acordo com vários estudos em gatos, concluiu-se que a técnica de ELISA era mais sensível que a IFI (Figueiredo *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2011; Da Silveira Neto *et al.*, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012) e que há pouca concordância entre as duas técnicas (Sobrinho *et al.*, 2012).

Rodríguez-Cortés *et al.* (2010), em cães, verificaram que os testes ELISA detetam a infecção por leishmania mais precocemente que a IFI, respetivamente, 4 e 8 meses após a infecção experimental. Em estudos em cães, o kit LEISCAN[®] *Leishmania* ELISA Test, foi superior à

IFI é considerado o teste mais adequado para detetar a infeção por *L. infantum* (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A comparação entre estes dois métodos serológicos não é linear, devido às diferenças relativamente à metodologia, aos limiares de positividade utilizados, ao tamanho e origem das amostras e a época em que se realiza o estudo. Há uma clara necessidade em padronizar protocolos, estabelecer limiares de positividade e definir um *gold standard*, tal como já se encontra feito no caso da LCan (Miró *et al.*, 2014).

O facto de todos os animais estudados terem um resultado negativo nos testes serológicos pode ser devido: a uma baixa produção de anticorpos anti-*Leishmania* na presença de infeção aliada, no caso da IFI, à utilização de apenas uma diluição (1:80), e no caso da técnica de ELISA, à utilização de um teste que tem por base os valores considerados para cães (razão da amostra); a estarem numa fase inicial da infeção em que ainda não houve seroconversão; a terem sido infetados mas o sistema imunitário ter conseguido eliminar os parasitas antes que houvesse seroconversão; ou, simplesmente, à ausência de qualquer contacto com o agente infeccioso e, logo, ausência de produção de anticorpos anti-*Leishmania*.

Os resultados negativos na diluição de 1:80 (limiar de positividade) por nós obtidos e o facto da seroprevalência da infeção por *Leishmania* spp. em gatos ser muitas vezes inferior à que tem sido encontrada em cães (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010), pressupõem que a resposta imunitária humoral felina à infeção por *Leishmania* spp. seja diferente da canina, nomeadamente que o título de anticorpos produzido pelos felinos seja muito reduzido (Maia & Campino, 2011b).

Vários autores sugerem que o gato possui uma resistência natural à infeção e ao desenvolvimento da doença na ausência de fatores imunossupressores, e que essa resistência se deve não só a uma resposta imunitária maioritariamente celular (Maia *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011), mas também a outros fatores genéticos (Mancianti, 2004). Para além disso, a baixa produção de anticorpos pode estar relacionada com o facto de a forma de leishmaniose mais comum nos gatos ser a cutânea e não a visceral (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

De acordo com Diakou *et al.* (2009), os gatos assintomáticos mas seropositivos estão numa das seguintes possibilidades: infetados que permanecem portadores assintomáticos, pelo menos até ao dia do exame clínico, ou foram expostos ao parasita, desenvolveram uma resposta imunitária e eliminaram os parasitas antes da infeção se desenvolver e ocorrerem sinais clínicos. Esta situação pode ainda acontecer caso ocorram reações cruzadas com outros agentes, como por exemplo *Trypanosoma cruzi* ou com outras espécies de *Leishmania* que não a pesquisada (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

O facto da maioria dos gatos não apresentar sinais clínicos e, simultaneamente, uma baixa produção de anticorpos específicos ou ausência de anticorpos em animais com lesões cutâneas ativas, leva a que a doença seja subdiagnosticada, aumentando a probabilidade de transmissão e disseminação do parasita aos vetores e, conseqüentemente, a outros hospedeiros vertebrados (Maia *et al.*, 2008).

Um estudo de Simões-Mattos *et al.* (2005), no qual se infetou experimentalmente gatos com *L. braziliensis*, revelou que o desenvolvimento de lesões cutâneas ativas é anterior ao aparecimento de títulos de anticorpos significativos e o seu pico de produção ocorreu quando as lesões cutâneas já estavam em fase de resolução, cerca das 26 semanas pós-infecção. O tamanho das lesões não estava também correlacionado com o título de anticorpos (Pennisi *et al.*, 2013). Também Kirkpatrick *et al.* (1984) demonstrou, através de infeção experimental por *L. infantum* em gatos, que os títulos de anticorpos não estão frequentemente correlacionados com os sinais clínicos (Sherry *et al.*, 2011).

Martín-Sánchez *et al.* (2007), no sul de Espanha, obtiveram uma seropositividade de 28% e 6,1%, respetivamente, em títulos de 1:40 e 1:160 e, ainda, a frequência de positivos no PCR com títulos ≤ 20 e com ≥ 40 era igual. Também Costa *et al.* (2010), Vides *et al.* (2011) e Sobrinho *et al.* (2012) encontraram uma fraca concordância entre a observação microscópica e a serologia (IFI e/ou ELISA), sendo que 70% a 75% dos gatos positivos à observação microscópica eram seronegativos. Estes 4 estudos, suscitaram a dúvida do valor dos métodos serológicos para detetar infeções ativas em gatos, uma vez que o título de anticorpos não está associado a infeção ativa (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Sobrinho *et al.*, 2012).

Estes estudos sugerem que a utilização apenas de métodos serológicos, e apesar da IFI ser considerada o *gold standard* para o diagnóstico serológico de LCan a nível mundial e ser uma técnica muito sensível em Portugal, tanto no Homem (83,3%) como no cão (87,5%), não será a melhor forma de chegar ao diagnóstico de LFel ou tão pouco da infeção por *Leishmania* spp. (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2008; Sherry *et al.*, 2011).

Assim, quando o resultado por uma técnica serológica quantitativa é negativo ou positivo baixo num gato com sinais clínicos ou alterações clinicopatológicas compatíveis com LFel, não deve ser excluído este diagnóstico e deve recorrer-se a métodos diretos, como citologia, histopatologia com IHQ, PCR ou cultura. Para isto, deve-se recolher amostras de lesões cutâneas ou nas mucosas e de linfonodos aumentados, complementando ainda com esfregaços de sangue, da camada flogística e de MO (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

No presente estudo foi utilizada a técnica de qPCR nas seguintes amostras biológicas: células conjuntivais obtidas por ZC (unilateral) e sangue, tendo obtido uma prevalência no total da amostra de, aproximadamente, 32% (15/47) e 25% (8/32), respetivamente.

Em Portugal, existem vários estudos nos quais foi utilizada a técnica de qPCR-kADN em sangue para o diagnóstico da infeção por *Leishmania* spp., cujas prevalências obtidas foram: 2% (1/50) (Martins, 2011), 10% (4/40) (Garrido, 2012), 0,5% (1/217) (Ramos, 2012), 5% (2/40) (Marques *et al.*, 2013) e 0,3% (1/320) (Vilhena *et al.*, 2013). Os resultados por nós obtidos, utilizando esta mesma técnica, são muito superiores aos obtidos comparativamente com estes estudos, tendo sido realizados os dois primeiros e o quarto estudos também na AML, o terceiro em Olhão e o último no norte e centro do país.

Existem outros estudos em Portugal nos quais se utilizaram a técnica de PCR-kADN convencional em sangue, com os seguintes resultados: 30,4% (7/23) (Maia *et al.*, 2008) e 20,3% (28/138) (Maia *et al.*, 2010), ambos na AML, valores estes mais próximos dos obtidos no nosso estudo. Maia *et al.* (2008) obtiveram 7 positivos em 23 gatos de rua e Maia *et al.* (2010) obtiveram 28 positivos em 138 gatos domésticos. A maior prevalência obtida no primeiro estudo comparativamente com o segundo deve-se, provavelmente, à realização em animais de rua, que se encontram mais expostos ao vetor (Maia *et al.*, 2010).

Recentemente, Maia *et al.* (2014) recorreram à técnica de *nested* PCR (nPCR) em sangue, tendo como alvo uma pequena subunidade de um gene de rARN, tendo obtido uma prevalência de 9,9% (64/649), em gatos domésticos e de rua dos distritos de Lisboa, Setúbal e Faro.

Uma prevalência elevada de *Leishmania* spp. no sangue de gatos que habitam em locais endémicos, indica que estes são frequentemente expostos ao vetor e colonizados pelo parasita (Maia & Campino, 2010b).

Relativamente à técnica de qPCR em CC, apenas existe um estudo epidemiológico realizado em gatos em Portugal que tenha utilizado este tipo de amostra biológica, no qual se obteve uma prevalência de 23,1% (9/39) (Marques *et al.*, 2013), valor próximo do obtido no nosso estudo. O estudo de Marques *et al.* (2013) foi realizado em gatos que habitavam em abrigos na AML e concluíram que este método de diagnóstico é sensível e económico, apresentando resultados promissores no diagnóstico da infeção por *Leishmania* spp.. Concluíram também que, tal como nos cães, a deteção de ADN em CC parece ser mais sensível que a técnica de WB.

Pennisi *et al.* (2012), na Sicília e Calábria, realizaram IFI (1:80) e qPCR em sangue, linfonodo e CC, onde obtiveram as seguintes prevalências: 6,9% (29/419) e 7,8% (16/203), 11,7% (18/154) e 16,7% (11/66), respetivamente.

Um estudo mais recente de Chatzis *et al.* (2014), na Grécia, no qual se utilizaram 100 gatos, metade clinicamente saudável e metade com sinais descritos de LFel, realizou-se citologia e PCR convencional. Amostras de pele, MO e CC foram utilizadas em ambas as técnicas e,

ainda, linfonodo na citologia e sangue no PCR. A citologia foi negativa em todas as amostras e as prevalências pela técnica de PCR foram: 18,2% (18/99), 16% (16/100), 13% (13/100) e 3,1% (3/96), respectivamente, na pele, MO, sangue e CC. Não houve concordância entre os resultados do PCR das diferentes amostras.

No nosso estudo, apenas se realizou ZC de um dos olhos do animal, havendo autores que, em cães, obtiveram prevalências superiores quando combinavam os resultados da qPCR em CC de ambos os olhos (Leite *et al.* 2010; Lombardo *et al.*, 2012). No entanto, outros autores afirmam que os resultados não são estatisticamente diferentes, e logo, pode-se realizar apenas zaragatoa de um dos olhos, sendo particularmente útil quando se realiza colheita num grande número de animais (De Almeida Ferreira *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2015).

Chatzis *et al.* (2014) concluíram com o seu estudo que com a exceção teórica das biópsias de pele que podem ser acidentalmente obtidas do local de recente inoculação, um PCR positivo em sangue, MO ou CC, indica a disseminação sistêmica do parasita.

Relativamente às cargas parasitárias obtidas neste estudo, o número de cópias da sequência alvo por amostra de CC variou entre 140 e 1187 (média: 547) e entre 880 e 3186 (média: 1652) no sangue. Apesar de não ser correto extrapolar o número de moléculas com significado biológico, obtido pela técnica de qPCR, correlacionando-as com a existência de amastigotas íntegros (Garrido, 2012), tal foi realizado no sentido de se poder comparar com os resultados obtidos por outros estudos, tendo-se obtido, em média, 0 L./amostra de CC e 1 L./ml de sangue.

No estudo de Maia *et al.* (2008), as cargas parasitárias variaram entre 0,4 e 8,6 *Leishmania*/nanograma de ADN de gato (L./ng). Pennisi *et al.* (2012) obtiveram as seguintes cargas parasitárias médias, através da qPCR em sangue, linfonodo e CC: 70,5 L./mL (10 – 770 L./mL), 10 L./amostra (1 – 1000 L./amostra) e 2 L./amostra (1 – 14 L./amostra).

As reduzidas cargas parasitárias obtidas no nosso estudo podem ser explicadas por estes animais se encontrarem ou na fase inicial da infeção, ou na fase de resolução, ou ainda por possuírem uma resposta imunitária humoral não significativa e uma resposta celular eficiente. Em cães, vários autores obtiveram baixas cargas parasitárias quando utilizavam CC como amostra biológica (Galletti *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2012; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012; De Almeida Ferreira *et al.*, 2013), apresentando como explicação uma baixa densidade parasitária no interior das pálpebras (De Almeida Ferreira *et al.*, 2012), possivelmente devido a um pequeno número de macrófagos infiltrados no epitélio conjuntival (Hernández *et al.*, 2015). Galletti *et al.* (2011) concluíram que a utilização de CC só é adequada para o diagnóstico da infeção nos casos em que a carga parasitária é grande, sendo que

aperfeiçoamentos na recolha das amostras e na extração de ADN poderão aumentar a sensibilidade da técnica.

Na maioria dos estudos em gatos, o sangue não parece ser a amostra biológica mais indicada para a técnica de PCR (Maia & Campino, 2011b), devido: a atuar como meio de transporte e não como órgão reservatório, como é o caso da MO (Hernández *et al.*, 2015); à carga parasitária no sangue tender a diminuir com o curso da infeção, com resultados positivos maioritariamente associados com os períodos de transmissão do vetor (Manna *et al.*, 2004; Di Muccio *et al.*, 2012) e a existirem dificuldades relacionadas com a extração de ADN e uma elevada presença de inibidores de PCR no sangue, que influenciam negativamente a sensibilidade (Lachaud *et al.*, 2002). Apesar de tudo, é comumente utilizado por a sua colheita ser fácil e menos invasiva comparativamente com MO ou linfonodo (Manna *et al.*, 2004; Pennisi, 2013).

Os factos indicados podem explicar a ocorrência de falsos negativos pelo PCR (Maia & Campino, 2008), concluindo-se que devem ser testados a maior variedade de tecidos disponíveis, de forma a diminuir a subestimação da prevalência da infeção (Chatzis *et al.*, 2014).

No nosso estudo, a prevalência obtida utilizando como amostra CC foi ligeiramente superior à encontrada utilizando sangue, constituindo o primeiro um método pouco invasivo que poderá, no futuro, vir substituir outros habitualmente utilizados.

A concordância entre os resultados da técnica de qPCR utilizando as duas amostras referidas é muito fraca ($k = 0,12$). Um valor baixo de k pode indicar que apenas um teste tem uma boa performance; os dois testes não apresentam uma boa performance ou que os dois testes têm boas performances, mas correlacionam-se negativamente (Thrusfield, 2007). Tal pode ser explicado por as cargas parasitárias presentes nas amostras recolhidas serem muito baixas ou, uma outra situação possível, por se encontrarem abaixo do limite de deteção da técnica, ou, ainda, por uma compartimentalização da infeção, tal como ocorre nos cães, em que a carga parasitária varia consoante o tecido devido ao tropismo do parasita e à imunidade específica do órgão em questão (Chatzis *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015).

Em estudos em gatos, as prevalências obtidas utilizando o sangue foram: mais baixas comparativamente com linfonodo (Pennisi *et al.*, 2012), equivalentes (Chatzis *et al.*, 2014) ou mais altas que na MO (Veronesi *et al.*, 2010) e mais baixas (Pennisi *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013) mas também mais elevadas relativamente às CC (Chatzis *et al.*, 2014).

Relativamente às prevalências obtidas utilizando CC, estas foram: superiores ao linfonodo (Pennisi *et al.*, 2012) e inferiores à MO e à pele (Chatzis *et al.*, 2014).

No entanto, a obtenção de CC através de ZC tem revelado bons resultados em gatos, tal como em cães, sendo apontada, por muitos autores, como a técnica ideal para estudos epidemiológicos com grande número de amostras, por se ter revelado bastante sensível e por ser uma técnica não invasiva ou muito pouco invasiva (Pennisi *et al.*, 2012; Baneth, 2013; Marques *et al.*, 2013).

Estudos realizados em cães demonstraram uma sensibilidade igual (Lombardo *et al.*, 2012) ou superior em amostras de CC relativamente a amostras invasivas (Di Muccio *et al.*, 2012; Ceccarelli *et al.*, 2014), quer em animais sintomáticos ou assintomáticos, reforçando a ideia da utilização deste método como alternativa a meios invasivos para a deteção da infeção por *Leishmania* spp..

Neste estudo, nenhum animal positivo pela técnica de qPCR foi positivo simultaneamente nas técnicas de IFI ou ELISA.

As diferenças entre as prevalências serológicas e moleculares em estudos epidemiológicos são de esperar, uma vez que a serologia reporta a exposição à infeção, através da deteção de anticorpos, e as técnicas moleculares avaliam a presença de infeção através da pesquisa de ADN parasitário. Por estas diferenças, não é correto comparar dois métodos tão distintos, sobretudo numa doença em que a imunidade celular parece ter um papel de extrema importância (Tabar *et al.*, 2008a).

Na maioria dos estudos realizados até hoje, a sensibilidade da deteção do parasita foi muito superior através de PCR comparativamente à serologia, e quando se compararam os resultados de ambas as técnicas não existia uma associação entre os mesmos (Martín-Sánchez *et al.* 2007; Ayllón *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Millán *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012; Perillo *et al.*, 2013). Os estudos de Pennisi (2002) e Sherry *et al.* (2011) constituem uma exceção.

Com base em alguns estudos longitudinais, gatos repetidamente positivos na PCR em sangue, o título de IFI não teve alterações significativas durante meses ou anos, tal como ocorre, tipicamente, em cães com infeções subclínicas (Pennisi *et al.*, 2000; Vita *et al.*, 2005; Maroli *et al.*, 2007; Martín-Sánchez *et al.*, 2007 citados por Pennisi, 2014).

Nos gatos, o diagnóstico definitivo é, normalmente, conseguido através de métodos diretos, como a citologia, cultura *in vitro* ou técnicas moleculares (Gramiccia, 2011).

De acordo com os estudos já realizados, as seguintes técnicas: exame citológico, exame histopatológico, ICQ e IHQ e cultura, possuem uma frequência de positivos relativamente menor (0% a 9,9%) em gatos comparativamente com os testes moleculares (Chatzis *et al.*, 2014). De acordo com Maia *et al.* (2008), Diakou *et al.* (2009) e Maia & Campino (2011a), o diagnóstico da infeção por *L. infantum* e de LFel devem incluir a técnica de PCR.

Tendo em conta os resultados serológicos negativos e os resultados positivos na qPCR com cargas parasitárias baixas obtidos no nosso estudo, o ideal seria a continuação da realização destas técnicas nestes animais para averiguar a evolução da resposta humoral e da carga parasitária ao longo do tempo, através de um estudo longitudinal.

Poucos dados foram até hoje obtidos a partir de estudos longitudinais. Em um desses estudos, 15 gatos (7 positivos e 8 negativos para anticorpos anti-FIV), com seroreatividade variável à *Leishmania* spp. (título entre <20 e 1280), foram seguidos durante 3 a 23 meses, e o seu título de anticorpos não teve modificações superiores a duas diluições e a técnica de PCR em sangue foi positiva em 69,4% (50/72) das amostras, sem diferenças significativas de acordo com a infeção por FIV. Estes achados argumentam a favor da possibilidade de uma infeção crónica por *Leishmania* spp. no gato (Pennisi *et al.*, 2000).

Um caso paradigmático nesse sentido é a de um gato positivo para anticorpos anti-*Leishmania*, com título entre 40 e 80, e PCR positivo pelo sangue durante 6 anos, veio a apresentar mais tarde, após tratamentos imunossupressores repetidos devido a uma gengivoestomatite crónica grave, uma linfadenopatia generalizada associada à infeção por *Leishmania* spp., confirmada por cultura e PCR (Maroli *et al.*, 2007).

De acordo com Maia & Campino (2011b) e segundo o nosso conhecimento, não existem até hoje nenhum estudo publicado que demonstre a resposta imunitária humoral e celular dos gatos na presença da infeção por *Leishmania* spp.. Estudos neste sentido serão essenciais para determinar se a baixa produção de anticorpos e a ausência de sinais clínicos são devidos a um equilíbrio entre sistema imunitário do gato e a presença do parasita ou se o gato consegue controlar a infeção porque ocorre eliminação do parasita (Maia & Campino, 2011b).

A sequenciação do ADN do parasita dos gatos infetados no nosso rastreio não foi realizada. No entanto, tendo em conta o método da técnica de qPCR com sonda não permissiva a *mispriming* (Garrido, 2012) e a informação epidemiológica sobre a doença em Portugal, é com alguma segurança que se pode supor que se trata da espécie *Leishmania infantum*.

Sabe-se que a espécie e zimodemo *L. infantum* MON-1 é responsável pela maioria dos casos de LCan e LHum no Mediterrâneo (incluindo Portugal) (Cardoso & Solano-Gallego, 2013). Desde 1980, na Europa, foram reportados vários casos de infeção por *Leishmania* spp. e alguns casos clínicos de LFel em gatos domésticos, sendo que a única espécie conhecida isolada em gatos foi *L. infantum* e o zimodemo mais comum o MON-1 (Pennisi, 2014). Além disto, através de PCR-RFLP concluiu-se que não existem diferenças genéticas nem fenotípicas entre as estirpes isoladas em cães e gatos (Pennisi, 2014).

No que se refere à avaliação de possíveis fatores de risco para a infeção por *Leishmania* spp. foram avaliados os seguintes: concelho, época de maior atividade do vetor, sexo, idade, raça,

tipo de pelagem, origem, habitat, coabitat com cães clinicamente saudáveis e com cães infectados por *L. infantum*, profilaxia com ectoparasiticidas, presença de doenças, existência de coinfeção por FIV/FelV. Foi também avaliada associação entre a presença de sinais clínicos compatíveis com LFel e a presença de infeção por *Leishmania* spp.. Após análise estatística, nenhum dos fatores estudado revelou uma associação estatisticamente significativa com os resultados obtidos através das técnicas moleculares realizadas.

O nosso estudo foi realizado em diversos concelhos da AML (Amadora, Cascais, Lisboa, Oeiras, Sintra e Vila Franca de Xira), tratando-se esta área um dos 4 focos com maior endemicidade de LCan em Portugal, para além de ser também endémica para a LHum e onde existe o maior número de casos desta, sobretudo em indivíduos com VIH (Campino & Maia, 2010; Maia *et al.*, 2010). Não existem estudos em gatos que diferenciem as prevalências dentro da AML e que demonstrem associações entre os concelhos onde vivem os animais e os resultados de técnicas de diagnóstico. Também no nosso estudo, o número de animais por concelho é demasiado pequeno para se tirar qualquer conclusão.

Não se verificou diferenças entre a recolha de amostras efetuada durante a época de maior atividade do vetor ou fora dela, tal como evidenciado por Pennisi *et al.* (2000), Ayllón *et al.* (2011) e Millán *et al.* (2011). No entanto, verificou-se uma prevalência mais elevada nos animais cujas amostras foram recolhidas durante a época de maior atividade do vetor, em ambas as amostras biológicas. Como a técnica qPCR deteta ADN do parasita, estes resultados estão de acordo com o esperado. As amostras positivas colhidas na época de maior atividade do vetor (Maio – Outubro) corresponderiam a uma infeção recente.

Maia *et al.* (2010), na AML, em gatos, realizaram um estudo comparativo entre o maior período de transmissão (Junho – Setembro) e quando praticamente é nula a transmissão (Outubro – Maio), obtendo prevalências, por PCR-kADN em sangue, de 22% no primeiro período, ligeiramente superior à do segundo período, 18,5%, concluindo que o gato, vivendo em áreas endémicas, está frequentemente em contacto com o parasita e que este pode colonizar o animal, pelo menos, por alguns meses.

Chatzis *et al.* (2014), na Grécia, obtiveram uma maior prevalência da infeção nas amostras colhidas de Abril a Novembro. Tal pode indicar que em alguns gatos ocorre uma infeção disseminada transitória durante este período e/ou que depois deste período a carga parasitária é reduzida e fica abaixo do limite de deteção da técnica de PCR (Chatzis *et al.*, 2014). No entanto, Pennisi *et al.* (2012), no sul de Itália, observaram que a seroprevalência e a prevalência molecular eram significativamente mais altas em amostras recolhidas entre Novembro e Abril, comparativamente às de Maio a Outubro.

No nosso estudo, todos os animais com idade inferior ou igual a 1 ano estiveram expostos a uma época de maior atividade vetorial, com exceção de apenas um animal, de 5 meses, com um exame clínico normal e cujo sangue foi colhido em Março de 2014. Este animal foi negativo em todas as técnicas utilizadas. Estes resultados, no caso das técnicas serológicas, poderia ser explicado por ser de facto negativo ou devido ao sistema imunitário ainda não se encontrar completamente desenvolvido, o que de acordo com Day (2007), ocorre por volta de 1 ano de idade na espécie felina e canina.

No nosso estudo, as maiores prevalências obtidas pela técnica de qPCR em CC e em sangue foram, respetivamente, no sexo feminino e no sexo masculino. Não houve qualquer associação entre o sexo e os resultados das técnicas de qPCR, estando de acordo com vários estudos que afirmam não haver predisposição sexual (Nasereddin *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008a; Sherry *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012). No entanto, outros trabalhos indicam um maior número de infetados do sexo masculino (Pennisi *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012) e um único trabalho aponta para o sexo feminino (Pennisi, 2002).

No estudo de Sobrinho *et al.* (2012), observou-se que os gatos machos tinham maior probabilidade de apresentarem sinais clínicos. Tal poderia ser explicado pelo comportamento mais *outdoor* característico deste sexo, no entanto todos os gatos do estudo eram de rua.

Relativamente à idade, a classe dos adultos e a dos idosos apresentaram as maiores prevalências na técnica qPCR em CC e em sangue, respetivamente. Estatisticamente, não se verificou relação entre a idade e os resultados relativos à presença de ADN, tal como em estudos anteriores (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Nasereddin *et al.*, 2008; Sobrinho *et al.*, 2012; Chatzis *et al.*, 2014).

Existem alguns estudos que mostram que a população com idade igual ou superior a 2 - 3 anos tem uma seroprevalência ou prevalência molecular significativamente maior (Pennisi, 2002; Cardoso *et al.*, 2010; Pennisi *et al.*, 2012). Pennisi *et al.* (2012) afirmam mesmo que idade igual ou superior a 3 anos é um fator de risco para a infeção. Maia *et al.* (2014) obteve uma maior prevalência molecular em animais com mais de 1 ano de idade.

Contudo, o estudo de Tabar *et al.* (2008a) mostra uma maior prevalência de doenças transmitidas por vetores em gatos com menos de 5 anos.

A maior prevalência nos animais idosos pode ser explicada pela exposição cumulativa à infeção (Cardoso *et al.*, 2010). Nos mais jovens pode ser atribuída ao seu comportamento mais ativo e a diferentes hábitos (como viverem na rua ou brincarem no exterior) (Tabar *et al.*, 2008a). Para além disto, a maior prevalência em gatos jovens e mais velhos está também relacionada com uma imunossupressão temporária nos primeiros (por desenvolvimento

incompleto do sistema imunitário) ou permanente (imunosenescência) nos idosos (Duarte *et al.*, 2010).

Quanto à raça, foi a raça Persa e a EC que apresentaram uma maior prevalência pela técnica de qPCR em CC e em sangue, respetivamente. Também Navarro *et al.* (2010) referiram a raça EC como a mais afetada, no entanto não existia associação estatística, tal como o obtido no nosso estudo. Isto está de acordo com o descrito pela grande maioria dos autores que afirma não existir predisposição racial (Nasereddin *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008a; Sherry *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012).

Relativamente ao tipo de pelagem, as maiores prevalências ocorreram em animais de pêlo comprido, no caso das CC, e em animais de pêlo curto, no caso do sangue. Não existem estudos exclusivamente sobre o tipo de pelagem dos gatos como fator de risco, uma vez que, tal como verificado neste estudo, está, normalmente, relacionado com a raça.

Relativamente à origem dos animais, apenas pudemos avaliar os animais de gatil através da amostra de CC, uma vez que nestes não foi possível realizar a técnica de qPCR em sangue. Assim, a maior prevalência, obtida através da técnica aplicada às células conjuntivais, ocorreu nos animais que habitavam no gatil. Não foi encontrada associação estatística, no entanto é de esperar que nestes animais a prevalência seja relativamente maior, uma vez que estavam expostos a mais agentes patogénicos, e, logo, a uma diminuição da imunidade, e ainda por coabitarem com cães infetados por *L. infantum*. No entanto, no estudo de Maia *et al.* (2014), realizado em gatos domésticos e de gatil dos distritos de Lisboa, Setúbal e Faro, as prevalências obtidas foram 10,3% (33/320) nos animais domésticos e 9,4% (31/329) nos de gatil.

No que respeita ao habitat, a maior prevalência, através de CC, foi obtida nos animais que se encontram num ambiente misto e, através de sangue, foi nos de interior. Não existe associação entre este fator e os resultados na deteção de ADN, estando de acordo com alguns autores, que concluíram que o acesso ao exterior não seria um fator de risco (Pennisi *et al.*, 2012). Ozon *et al.* (1999) encontraram uma seroprevalência mais alta em animais com acesso ao exterior (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). O animal que viajava para o Algarve no verão com os seus donos foi negativo em todas as técnicas realizadas.

Tendo em conta o fator de coabitação com cães infetados por *L. infantum* e os resultados na técnica de qPCR em CC, a maior prevalência foi nos animais que coabitavam com estes cães. No entanto, não existe qualquer associação estatisticamente significativa entre este fator e os resultados obtidos por esta técnica. Ao que sabemos, não existem estudos que tenham em conta esta convivência, no entanto seria importante avaliar a mesma associação num maior número de animais. De notar, que a seroprevalência de anticorpos anti-*L. infantum* nos cães

do Canil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira era, cerca de, 28,8% (Santos, 2014).

Sabe-se que os flebótomos se alimentam naturalmente de sangue felino (Maroli *et al.*, 2009; Afonso *et al.*, 2012), que são frequentemente picados por *P. perniciosus* (Colmenares *et al.*, 1995 citado por Maia *et al.*, 2010) e, até mesmo, que o sangue de gato é mais atrativo e é mais frequentemente ingerido por algumas espécies de flebótomos, não encontradas em Portugal, que o dos cães (Johnson, Ngumbi, Mwanyumba & Roberts, 1993; Ogusuku *et al.*, 1994). Maroli *et al.* (2009), na Síria, concluíram ainda que *P. sergenti* preferia alimentar-se de gatos e aves e que *P. papatasi* prefere cães e gatos (Longoni *et al.*, 2012). Assim, a probabilidade dos vetores mais comuns em Portugal, *P. perniciosus* e *P. ariasi*, se terem alimentado dos gatos e cães que coabitavam juntos é bastante elevada.

No que se refere à profilaxia contra ectoparasitas, não se verificou qualquer relação entre este fator e os resultados da presença/ausência de ADN de *Leishmania* spp.. Nenhum dos ectoparasiticidas continha piretróides ou piretrinas como substâncias ativas, por serem, na sua maioria, tóxicas para os gatos. De referir que a maior prevalência, utilizando a CC como amostra biológica, foi em animais aos quais eram aplicados os ectoparasiticidas. No sangue, a prevalência foi igual em animais tratados e em não tratados. Maia *et al.* (2014) obtiveram uma maior prevalência em animais aos quais foi realizada profilaxia contra ectoparasitas, atribuindo este facto ao acaso, uma vez que os ectoparasiticidas utilizados não possuíam qualquer substância ativa com ação repelente sobre os flebótomos.

No que diz respeito à presença de doenças nos animais em estudo, constatou-se que a prevalência da infeção por *Leishmania* spp. era maior nos animais sem doença, quando se utilizou CC, e ligeiramente maior nos animais com doença, através de sangue. Neste estudo, existiam 14 animais com doenças de várias etiologias. Os animais com doença e positivos pela técnica de qPCR, possuíam as seguintes doenças: panleucopénia felina, hemoplasmoze (*Mycoplasma haemofelis*), IRC, linfoma renal (ambos com FeLV), linfoma intestinal e doença broncopulmonar.

Relativamente ao *Mycoplasma haemofelis*, não há relatos de reações serológicas cruzadas como as que podem ocorrer na presença de *Trypanosoma cruzi* e de outras espécies de *Leishmania* (Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Suspeita-se que outros agentes como *Rickettsia felis*, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* e *Toxoplasma gondii*, possam causar estas reações, no entanto não se encontra comprovado cientificamente (Spada *et al.*, 2013).

Todos os sinais de IRC (por exemplo vómitos, anorexia, PU/PD e letargia) podem também ocorrer em felinos com leishmaniose (Pennisi, 2002; Navarro *et al.*, 2010; Maia & Campino,

2011a; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Sabe-se que a IRC pode ser uma consequência do desenvolvimento de LFel, tal como ocorre nos cães (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Pennisi, 2014).

No nosso estudo, apenas 2 animais eram positivos para o FeLV e ambos foram positivos na técnica utilizando a CC e apenas um no sangue. Sabe-se que a infecção pelo retrovírus FeLV causa imunodeficiência e neoplasias nos gatos domésticos, sendo o linfoma a mais comum (Barr, 2011b). Os sinais clínicos de linfoma renal são compatíveis com IR (Fan, 2011). Relativamente à relação entre a infecção por FeLV e a infecção por *Leishmania* spp., dois estudos evidenciam que estão associadas (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Sherry *et al.*, 2011). Sherry *et al.* (2011) observaram uma associação positiva entre a positividade ao género *Leishmania* (molecular e serológica) e a presença de FeLV e da coinfeção de FIV e FeLV. Martín-Sánchez *et al.* (2007) encontraram uma associação negativa entre a seropositividade ao género *Leishmania* e a infecção por FeLV, ou seja, a produção de anticorpos contra o parasita parece estar comprometida em gatos com leucemia.

No nosso estudo não foi possível tirar qualquer conclusão relativamente ao FIV, pois apenas um animal possuía este retrovírus, no entanto este foi negativo em todas as técnicas. Alguns estudos mostram uma maior seroprevalência (Ayllón *et al.*, 2011; Vides *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2013) e prevalência por PCR (Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012) em gatos FIV positivos. Contudo, apenas 3 estudos encontraram associação entre a infecção por FIV e a infecção por *Leishmania* spp. (Ayllón *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2012; Sobrinho *et al.*, 2012).

Martín-Sánchez *et al.* (2007), Ayllón *et al.* (2008), Tabar *et al.* (2008a) e Maia *et al.* (2010) não encontraram associação entre serologia e presença de *Leishmania* spp. por PCR com a infecção por FIV.

Em humanos com VIH foi demonstrado que é mais frequente encontrar-se o parasita no seu sangue do que em pessoas negativas, sendo sugerido que tal também possa ocorrer nos gatos infetados pelo FIV (Grevot *et al.*, 2005).

Apesar da associação entre estes dois retrovírus e a infecção por *L. infantum* (Sobrinho *et al.*, 2012) e de vários casos clínicos de LFel terem sido reportados em animais que possuíam simultaneamente infeções retrovirais (Sherry *et al.*, 2011), é ainda controverso se a coinfeção retroviral é ou não um fator de risco para LFel (Sobrinho *et al.*, 2012). Pennisi *et al.* (2012) afirmaram mesmo que a infecção por FIV se trata de um fator de risco. A infecção por este vírus pode produzir sinais clínicos idênticos aos de leishmaniose, sendo importante testar coinfeções em áreas endémicas de leishmaniose (Sobrinho, *et al.*, 2012).

A infecção por *Leishmania* spp. pode estar associada, concomitantemente, com doenças dermatológicas, nomeadamente pênfigo foliáceo, carcinoma das células escamosas, complexo eosinofílico felino e demodicose (Rüfenacht *et al.*, 2005; Grevot *et al.*, 2005; Pennisi & Solano-Gallego, 2013a). Por isso, quando gatos aparecerem com lesões nodulares, ulcerativas ou com crostas, cutâneas, mucocutâneas ou oculares, a LFel deve fazer parte dos diagnósticos diferenciais e ser investigada, sobretudo em áreas endémicas (Navarro *et al.*, 2010; Vides *et al.*, 2011). Alguns autores, como Leiva *et al.* (2005) e Ayllón *et al.* (2011), obtiveram nos seus estudos uma associação significativa entre a presença de anticorpos anti-*L. infantum* e a presença de estomatite.

Assim, sabe-se que, em gatos, na presença de situações imunossupressoras, como infeções por retrovírus ou vírus da peritonite infecciosa felina (PIF), stress, senilidade, doenças mieloproliferativas, doenças autoimunes (pênfigo foliáceo), neoplasias (carcinoma das células escamosas), diabetes *mellitus* ou tratamentos com corticosteróides ou outros fármacos imunossupressores, pode ser induzida uma disfunção imunológica, levando a uma resposta imunitária celular pouco eficaz e facilitando o desenvolvimento da leishmaniose (com multiplicação ativa do parasita) e a sua disseminação visceral (Dalmau *et al.*, 2008; Pennisi *et al.*, 2013; Spada *et al.*, 2013). A presença dos vírus FIV ou FeLV não é suficiente para afirmar que são estes os responsáveis por um estado de imunodeficiência (Poli *et al.*, 2002).

Quanto a sinais compatíveis com LFel, apenas 6 animais os apresentavam, nomeadamente feridas de difícil cicatrização (n=1), gengivite (n=1) e sinais clinicopatológicos de IRC (anorexia, desidratação, azotémia, hiperfosfatémia, proteinúria, atrofia renal) (n=4). Em nenhum dos animais se suspeitou de LFel como doença primária.

Os animais com os primeiros dois sinais possuíam, respetivamente, FIV e FeLV isoladamente. Ambos os vírus podem causar infeções ou feridas cutâneas (recorrentes, crónicas ou não responsivas ao tratamento), gengivites, estomatites e periodontites (Barr, 2011a e Barr, 2011b). O animal com as feridas de difícil cicatrização foi negativo em todos os meios de diagnóstico utilizados. O gato com gengivite era um dos animais positivos que possuía um linfoma renal associado ao FeLV. Dos animais com sinais clinicopatológicos de IRC, 2 foram positivos para a presença de ADN de *Leishmania* spp., um pela técnica de qPCR em CC e outro em sangue.

Enquanto Sherry *et al.* (2011) e Sobrinho *et al.* (2012) encontraram uma associação entre a infecção e a presença de sinais clínicos compatíveis com LFel, Martín-Sánchez *et al.* (2007), Nasereddin *et al.* (2008) e Pennisi *et al.* (2012) não obtiveram qualquer associação entre a doença e sinais clínicos, o que tem vindo a ser explicado pela resistência natural dos gatos ao parasita (Chatzis *et al.*, 2014). Chatzis *et al.* (2014) não obtiveram associação entre o estado

clínico dos gatos (saudável/doente) e a presença de infeção mas a infeção estava associada positivamente à presença de, pelo menos, um sinal clínico sistémico já descrito para LFel.

A maioria dos gatos, cerca de 73%, que desenvolvem sinais clínicos de LFel é suspeita de ter alguma condição que prejudica o seu sistema imunitário, como os exemplos referidos acima (Pennisi *et al.*, 2013). O facto dos sinais clínicos não serem patognomónicos nesta doença, ocorrendo sobretudo sinais compatíveis com outras doenças mais comuns nos gatos, como o exemplo dos sinais cutâneos, contribuí para a subestimação da mesma. Assim sendo, a LFel deve estar presente nos diagnósticos diferenciais de doenças com sinais compatíveis com esta doença, sobretudo em zonas endémicas (Diakou *et al.*, 2009).

Com base em tudo o que foi discutido, a profilaxia da infeção por *Leishmania* spp. em gatos torna-se imperativa. No entanto, a realização de uma profilaxia com base em inseticidas piretróides, como a que é utilizada em cães, constitui uma limitação no caso dos gatos. Ao que se sabe, não foi ainda demonstrado se alguma das substâncias ativas contidas nos produtos atualmente comercializados para gatos tem ação repelente sobre os insetos do género *Phlebotomus*.

Um produto promissor é a coleira Seresto[®], que está licenciada para cães e gatos, e que possui um efeito sinérgico entre o imidaclopride e a flumetrina, sendo este o único piretróide aprovado para gatos. No entanto, a ação deste como inseticida sobre os flebótomos só foi estudada em cães (Otranto *et al.*, 2013; Brianti *et al.*, 2014). Estes estudos revelaram que a coleira era segura e tinha uma elevada eficácia na prevenção da infeção por *L. infantum* em cães. Serão agora necessários estudos para avaliar a sua ação em gatos.

Assim, alguns autores consideram o gato como possível hospedeiro reservatório alternativo ao cão, e não apenas um hospedeiro secundário (Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011a), sendo o cão considerado como o principal hospedeiro reservatório doméstico/peridoméstico de *L. infantum* devido: à infeção ser frequentemente detetada na população; à duração da infeção sem a manifestação de sinais clínicos; à apresentação de uma carga parasitária suficiente no tecido cutâneo e sangue periférico, aumentando a possibilidade de transmissão para o vetor; à estreita relação com os seres humanos e por apresentarem parasitas indistinguíveis dos isolados a partir de casos humanos; pelas preferências hemáticas dos vetores, que se alimentam frequentemente neles; e a estar provado que são infetantes para o vetor (Maia & Campino, 2011b).

Para além das limitações do estudo que tem vindo a ser apontadas ao longo da discussão, é ainda de referir o facto de a amostra ser relativamente pequena para chegar a conclusões definitivas acerca da prevalência da infeção na AML ou de possíveis associações com determinados fatores a extrapolar para a população da área analisada. As principais razões

para tal foram limitações económicas do estudo associadas à difícil aceitação por parte dos donos para a recolha das amostras nos seus gatos. No que se refere aos gatos do gatil, os fatores condicionantes foram dificuldades no manuseamento dos animais associadas ao desconhecimento ou insuficiente informação sobre a história pregressa, assim como limitações económicas que impossibilitam a realização do teste de FIV/FelV.

IV – CONCLUSÃO

O estágio curricular realizado no Hospital Veterinário VetOeiras permitiu a aquisição de conhecimentos e de competências fundamentais, sobretudo a nível prático, para a realização futura da atividade profissional veterinária em diversas vertentes da área de Clínica de Animais de Companhia, como a Medicina Interna, Imagiologia e Cirurgia.

A realização desta dissertação de mestrado contribuiu para o aprofundamento dos conhecimentos teóricos acerca do tema desenvolvido e para o contacto com várias técnicas laboratoriais de diagnóstico parasitológico.

Nos últimos anos, um número crescente de casos de LFel tem sido reportado a nível mundial, assim como vários rastreios epidemiológicos têm demonstrado um número considerável de animais infetados, o que leva a questionar qual será o papel epidemiológico do gato doméstico nesta doença.

O nosso estudo, realizado na AML, demonstrou uma prevalência da infeção por *L. infantum*, baseada na deteção de ADN, relativamente elevada em gatos domésticos e de gatil que habitam numa região endémica de LCan. A presença de animais positivos em amostras de sangue e células conjuntivais indica que a infeção é uma realidade e que os animais que habitam esta área estão frequentemente expostos aos vetores e ao parasita.

As técnicas serológicas utilizadas neste trabalho não permitiram a deteção de anticorpos anti-*L. infantum* em gatos assintomáticos, constituindo a técnica de qPCR uma alternativa mais viável para a deteção da infeção, apesar das reduzidas cargas parasitárias encontradas.

O material colhido através de ZC permitiu detetar um maior número de animais com presença de ADN de *L. infantum* comparativamente ao sangue, destacando esta amostra pouco invasiva como indicada para futuros estudos de avaliação da infeção por *L. infantum* em gatos.

Em termos de perspetivas futuras, realça-se a importância da realização de mais estudos epidemiológicos num maior número de animais, utilizando a técnica de qPCR em células conjuntivais como método pouco invasivo.

Seria também de extrema importância o estudo da resposta imunitária humoral e celular no gato quando infetado por *Leishmania* spp. e a sua comparação com o cão, afim de se determinar a verdadeira importância da imunidade celular na defesa contra a infeção e o papel da imunidade humoral.

V - BIBLIOGRAFIA

- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: bioecologia dos vectores. In G. M. Santos-Gomes & I. M. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 27 – 40). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Afonso, M.M.S., Duarte, R., Miranda, J.C., Caranha, L., Rangel, E.F. (2012). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of american visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 1 – 5.
- Ait-Oudhia, K., Harrat, Z., Benikhlef, R., Dedet, J.P. & Pratlong, F. (2011). Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: A review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Tropica*, 118, 80 – 86.
- Alexandre-Pires, G.M. & Correia, J.J. (2008). Capítulo IV: patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G. M. Santos-Gomes & I. M. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 53 – 68). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Andrade, H.M., De Toledo, V. De P., Marques, M.J., França Silva, J.C., Tafuri, W.L., Mayrink, W. & Genaro, O. (2002). *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology*, 103, 71 – 81.
- Andrade, A.S.R. & Melo, M.N. (2013). Chapter 9: Non-invasive molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis using conjunctival swab samples. In D.M. Claborn, *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. (pp. 195 – 216).
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. & Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Eurosurveillance*, 18 (30), 1 – 8.
- Área Metropolitana de Lisboa [AML] (2014). Área Metropolitana de Lisboa – Território. Acedido a 8 de Novembro de 2014, disponível em: <http://www.aml.pt/aml/territorio/>.
- Ashford, R.W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14, 523 – 532.
- Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1269 – 1281.
- Ayllón, T., Tesouro, M., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2008). Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 1149, 361 - 364.
- Ayllón, T., Diniz, P.P.V., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2011). Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12 (2), 143 – 150.
- Baneth, G. & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14 – 15.

- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24 (7), 324 - 330.
- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012a). Canine leishmaniosis. In C.E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th ed.). (pp. 735 - 745). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012b). Feline leishmaniosis. In C.E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th ed.). (pp. 748 - 749). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012c). Global aspects of leishmaniosis. In C.E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th ed.). (pp. 734 - 735). Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Baneth, G. (2013). A comparison of non-invasive and invasive diagnostic methods for canine leishmaniosis. In *Proceedings of the International SCIVAC Congress: Canine Leishmaniosis and Other Vector-Borne Diseases - Our Current State of Knowledge, Pisa, Itália, 8 – 10 March*, pp. 16 – 21.
- Bañuls, A.-L., Hide, M. & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1 – 113.
- Barr, S.C., Bowman, D.D., Hendrix, C.M., Lindsay, D.S. (2002). *Feline clinical parasitology*. (pp. 70 - 76). Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Barr, M.C. (2011a). Feline immunodeficiency virus infection. In L.P. Tilley & W.K. Smith, *Blackwell's Five-Minutes Veterinary Consult: Canine and Feline*. (5th ed.). (pp. 466 – 467). Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Barr, M.C. (2011b). Feline leukemia virus infection. In L.P. Tilley & W.K. Smith, *Blackwell's Five-Minutes Veterinary Consult: Canine and Feline*. (5th ed.). (pp. 472 – 473). Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Basso, M.A., Marques, C.S., Duarte, A., Pissarra, H., Carreira, L.M., Valério-Bolas, A., Santos-Gomes, G., Tavares, L., & Pereira da Fonseca, I. (2013). The forgotten disease of cats: a case of feline leishmaniosis [Abstract]. In *Proceedings of the 5th World Leish Congress, Porto de Galinhas, Brazil, 13 – 17 May*, P 772.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097 - 1106.
- Bayer (2012). Antiparasitário Seresto. <http://www.noticiasaxoncomunicacion.net/2012/03/bayer-presenta-en-propet-seresto-un-antiparasitario-externo-contra-pulgas-y-garrapatas-para-perros-y-gatos-que-ofrece-hasta-8-meses-de-proteccion/>
- Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K. & Peterson, C.A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means

- for continued disease incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 (4), 1 – 6.
- Braga, A.R.C., Langoni, H. & Lucheis, S.B. (2014). Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20, 1 – 7.
- Bray, R. (1982). The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecology of Disease*, 1, 257 - 267.
- Campino, L. (2002). Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In Farrel, J.P., *World Class Parasites Leishmania*, vol. 4. (pp. 45 – 57). London, UK: Kluwer Academic Publishers.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, 859 - 864.
- Cardoso, L.M.M.L. (2004). *Estudos de infecção canina por Leishmania no Alto Douro*. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K. & Schallig, H. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174, November 2010, pp. 37 - 42.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5, 1 – 9.
- Cardoso, L. & Solano-Gallego, L. (2013). Capítulo 2: epidemiología en Europa. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: una revisión actualizada*. (pp. 17 – 30). Zaragoza, Espanha: Server editorial – Grupo Asís Biomedica S.L.
- Casimiro, E., Calheiros, J., Santos, F.D. & Kovats, S. (2006). National assessment of human health effects of climate change in Portugal: Approach and key findings. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12), 1950 – 1956.
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Sisti, D., Bianchi, B. & Magnani, M. (2014). Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters. *Parasites & Vectors*, 7.
- Chatzis, M.K., Andreadou, M., Leontides, L., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Koutinas, A.F., Rallis, T., Ikonomopoulos, J. & Saridomichelakis, M.N. (2014). Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Veterinary Parasitology*, 2002 (3 – 4), 217 - 225.
- Coelho, W.M., Do Amarante, A.F., Apolinario, J., Cohelo, N., De Lima, V.M.F., Perri, S.H. & Bresciani, K.D. (2011). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora*

caninum and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitology Research*, 109, 1009 – 1013.

- Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobano, C., Gallego, M., Wolf, M. & Seguí, G. (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology*, 32, 229 - 233.
- Corrales, G.M. & Moreno, R.M. (2006). *Leishmaniosis canina: Manejo Clínico y Situación Actual en España*. ISBN-10: 84-690-1057-3, pp. 15 - 56.
- Corrales, G. M. (2013). Capítulo 8: tratamiento y pronóstico. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: una revisión actualizada*. (pp. 153 – 163). Zaragoza, Espanha: Server editorial – Grupo Asís Biomedica S.L.
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology Internacional*, 55 (7), 277 - 283.
- Cortes, S., Afonso, M., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Disease*, 13, 1431 - 1432.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189, 189 – 196.
- Costa, T.A.C. (2008). *Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral felina*. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista.
- Costa, T.A.C., Rossi, C.N., Laurenti, M.D., Gomes, A.A.D., Vides, J.P., Sobrinho, L.S.V. & Marcondes, M. (2010). Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47 (3), 213 – 217.
- Costa-Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (concelho de Semsimbra). Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89 (551), 140 – 144.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, 149 - 155.
- Coutinho, M.T.Z. & Linardi, P.M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Veterinary Parasitology*, 147, 320 - 325.
- Crispin, S. (2002). Capítulo 7: The conjunctiva. In S. Petersen-Jones & S. Crispin, *Small Animal Ophthalmology*. (2nd ed.). (pp. 124). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.

- Da Silveira Neto, L., Sobrinho, L.S., Martins, C., Machado, R., Marcondes, M. & De Lima, V. (2011). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology*, 177, 374 – 377.
- Dalmau, A., Ossó, M., Oliva, A., Anglada, L., Sarobé, X. & Vives, E. (2008). Leishmaniosis felina a propósito de un caso clínico. Nos olvidamos de que existe?. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales - AVEPA*, 28 (4), 233 – 237.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S. & Otranto, D. (2011). Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 4, 1 – 4.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., De Paiva-Cavalcanti, M. & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the old and new worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28 (12), 531 – 538.
- Dantas-Torres, F. (2013). Changing epidemiology of vector-borne diseases. In *Proceedings of the International SCIVAC Congress: Canine Leishmaniosis and Other Vector-Borne Diseases - Our Current State of Knowledge, Pisa, Itália, 8 – 10 March*, pp. 50 – 51.
- Day, M.J. (2007). Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 137, S10 – S15.
- De Almeida Ferreira, S., Ituassu, L.T., Melo, M.N. & De Andrade, A.S.R. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 152, 257 – 263.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., De Andrade, A.S.R. & Melo, M.N. (2012). Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (4), 1 – 9.
- De Almeida Ferreira, S., Almeida, G.G., Silva, S.O., Vogas, G.P., Fujiwara, R.T., De Andrade, A.S.R. & Melo, M.N. (2013). Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (4), 1 – 8.
- De Arruda, M.M. (2010). Leishmanioses. In *Manual de Zoonoses* (2ª edição). (pp. 68 – 90). Programa de Zoonoses da Região Sul. Acedido em 5 de Abril de 2014, disponível em: http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1258562831/6365_crmv-pr_manual-zoonoses_leishmanioses.pdf
- De Freitas, J. C. (2010). Plano de pormenor da intervenção na margem direita da foz do rio Jamor – Caracterização da vegetação. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa – Departamento de Engenharia Civil, pp. 1 - 4. Disponível em: http://www.cm-oeiras.pt/municipio/BolMunOnl/avisos1/relatorios_de_especialidade/CARACTERIZACAO%20DA%20VEGETACAO.pdf

- De Freitas, E., Melo, M.N., Pimenta Da Costa-Val, A. & Marques-Michalick, M. S. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137, 159 - 167.
- De Oliveira, A.G. (2009). *Bioestatística, epidemiologia e investigação – Teoria e aplicações*. Lisboa: Lidel – edições técnicas, Lda.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J. & Trials Study Group, TB. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*, 354, 34 – 39.
- Di Muccio, T., Fiorentino, E., Manzillo, F., Cappiello, S., Oliva, G., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2008). The potential role of conjunctival swab analysis for the early detection of *Leishmania*-dog contacts: a preliminary study. *Parassitologia*, 50 (1-2).
- Di Muccio, T., Veronesi, F., Antognoni, M.T., Onofri, A., Fioretti, D.P. & Gramiccia, M. (2012). Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (8), 2651 – 2659.
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 728-730.
- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K. & Walton, S.F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41, 571 - 579.
- Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I.M., Almeida, V., Carvalho, L.M., Meireles, J., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 441-444.
- Fan, T. M. (2011). Lymphoma – cats. In L. P. Tilley & W. K. Smith (5th ed.), *Blackwell's Five-Minutes Veterinary Consult: Canine and Feline*. (pp. 776 – 777). Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Faria, T. (2008). *Estudo sero-epidemiológico da infecção por Leishmania infantum em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Fernández-Pérez, F.J., Méndez, S., De La Fuente, C., Gómez-Muñoz, M.T. & Alunda, J.M. (1999). Improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 652 - 653.
- Ferrer, L. (1999). Leishmaniosis canina: actualización en diagnóstico y terapêutica. *Actas do Congresso de Neurologia e Dermatologia em Animais de Companhia*, 74 – 82.

- Ferreira, A.M.P.J. (2000). Capítulo 2: caracterização de Portugal Continental. In *Dados geoquímicos de base de sedimentos fluviais de amostragem de baixa densidade de Portugal Continental: Estudo de factores de variação regional*. Tese de Doutoramento em Geociências. Aveiro: Universidade de Aveiro, pp. 24 - 27. Disponível em: <http://www.lneg.pt/download/3259/cap2.pdf>
- Ferreira, P.R.B., Larangeira, D.F., Oliveira, L.S., Malta, M.C.C., Gomes, M.C., Bastos, B.L., Portela, R.W. & Barrouin-Melo, S.M. (2013). Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (4), 528 - 534.
- Figueiredo, F., Bonnal, C., Nascimento, L., Da Costa, T., Baptista, C. (2009). Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cassia, município de Barra Mansa, Estado de Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42, 141 – 145.
- Foglia Manzillo, V., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Paparcone, R., Fiorentino, E., Gizzarelli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Oliva, G. (2013). Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7 (5), e2225.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A. & Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137, 214 - 221.
- Galletti, E., Bonilauri, P., Bardasi, L., Fontana, M.C., Ramini, M., Renzi, M., Dosa, G. & Meriardi, G. (2011). Development of a minor groove binding probe real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dogs specimens. *Research in Veterinary Science*, 91, 243 – 245.
- Garrido, J.M.C.B.G. (2012). *Contribuição para o estudo da prevalência da infeção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2013). Evaluation of conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *The Veterinary Journal*, 198, 187 – 192.
- Giger, U., Oakley, D.A., Owens, S.D. & Schantz, P. (2002). *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion*, 42, 381 - 382.
- Giménez, T. P., Repiso, M.L. & Freixa, C.N. (2013). Capítulo 6: manifestaciones clínicas oculares. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: Una revisión actualizada*. (pp. 99). Zaragoza, Espanha: Server editorial – Grupo Asís Biomedica S.L.
- Gomes, Y.M., Cavalcanti, M. P., Lira, R.A., Abath, F.G.C. & Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45 - 52.

- Gradoni, L., Gramiccia, M., Khoury, C. & Maroli, M. (2004). Guidelines for the control of the canine reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis in Italy. *In Proceedings Istituto Superiore di Sanità 04/12 Edition, Rome, Italy*, pp. 1 - 20.
- Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2008). Leishmaniosis. *In OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*, vol. 1, 6th ed. Office International des Epizooties, Paris, pp. 240 - 250.
- Gramiccia, M. Di Muccio, T., Vitale, F., Caracappa, S., Reale, S. & Pennisi, M.G. (2005). *Leishmania infantum* characterization from three cases of feline leishmaniasis in Sicily (Italy) (Abstract). *In Abstract book WorldLeish 3*, 146.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169 - 1180.
- Gramiccia, M., Bongiorno, G., Di Muccio, T., Fiorentino, E., Scalone, A., Venco, L., Mortarino, M., Morosetti, G., Gradoni, L. & Maroli, M. (2010). The emergence of zoonotic visceral leishmaniasis in northern Italy: a compendium of 2005 - 2009 studies. *In Proceedings of the International Conference EDEN, Montpellier, France, 10 - 12 May*, pp. 36.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181, 23 - 30.
- Grant, C.K., Fink, E.A., Sundstrom, M., Torbett, B.E. & Elder, J.H. (2009). Improved health and survival of FIV-infected cats is associated with the presence of autoantibodies to the primary receptor, CD134. *PNAS*, 106, 19980 - 19985.
- Grevot, A., Hugues, J.P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas P., Breton, C. & Bourdoiseau, G. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, 12, 271 - 275.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L. & Pereira da Fonseca, I. (2013). Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus rattus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasites & Vectors*, 6 (88), 1 - 6.
- Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M.S., Baneth, G., Miró, G. (2015). Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 207 (1 - 2), 149 - 155.
- Hervás, J., Chacon-Manrique De Lara, F., Sanchez-Isarria, M., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J. & Gomez-Villamandos, J. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 1 (2), 101 - 105.
- Hervás, J., Pérez, J., Chacon-Manrique De Lara, F., López, J., Moreno, A. & Gómez, J. (2002). Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniosis. *In Proceedings 27th WSAVA Congress, Granada, Espanha*.

- Hide, M., Bañuls, A. & Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* zymodeme MON-1. Epidemiological Implications. Acedido em 20 de Maio de 2014, disponível em: <http://gemi.mpl.ird.fr/PDF/HidePARASITOLOGY2001.pdf>
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, S., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J.-L. & A.-L. Bañuls (2007). Chapter 6: understanding human leishmaniasis - the need for an integrated approach. In M. Tibayrenc, *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. (pp. 87 – 88). New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Hubálek, Z. & Rudolf, I. (2011). Chapter 8: systematic survey of zoonotic and sapronotic microbial agents. In *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. (pp. 280 - 282). New York, USA: Springer Science.
- Huebner, J., Muller, E., Langben-Detsch, I. & Kissingen, B. (2008). Serological survey of *Leishmania* infections in cats from north Greece. In *Proceedings Forum American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), San Antonio, Texas (USA)*, pp. 782 – 783.
- Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores [IESC] (2008). *Plano Regional de Ordenamento do Território da Área Metropolitana de Lisboa*. Acedido a 10 de Novembro de 2014, disponível em: <http://protaml.inescporto.pt/>.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera [IPMA] (2014). *Instituto Português do Mar e da Atmosfera: Boletins climatológicos*. Acedido a 10 de Novembro de 2014, disponível em: <https://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=bpm&cmbAno=2012&idDep=cli&idTema=&curAno=-1>.
- Johnson, R.N., Ngumbi, P.M., Mwanyumba, J.P. & Roberts, C.R. (1993). Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 7, 216 – 218.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in Parasitology*, 22 (9), 439 – 445.
- Killick-Kendrick, R. (1999). Biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3), 279 - 289.
- Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P. & Goldschmidt, M.H. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. *Experimental Parasitology*, 58, 125 - 131.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, S., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), 95 - 125.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P. & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (1), 210 – 215.

- Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A. & McMaster W.R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152 (1), 35 - 46.
- Leite, R.S., De Almeida Ferreira, S., Ituassu, L.T., De Melo, M.N. & De Andrade, A.S.R. (2010). PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology*, 170, 201 – 206.
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T. & Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, 8 (1), 71 - 75.
- Lima, V.M.F., Biazzone, L., Silva, A.C., Correa, A.P.F.L. & Luvizotto, M.C.R. (2005). Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25 (4), 215 – 218.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A. & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184, 10 – 17.
- Longoni, S.S., Lopez-Cespedes, A., Sanchez-Moreno, M., Bolio-Gonzales, M.E., Sauri-Arceo, C.H., Rodriguez-Vivas, R.I., Marin, C. (2012). Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase secreted as antigen. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 35, 469 - 476.
- Lunedo, S.N., Thomaz-Soccol, V., de Castro, E.A. & Telles, J.E.Q. (2012). Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochemica*, 114 (3), 252 - 258.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158 (4), 274 - 287.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8 (4), 555 – 559.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Nunes, M., Martins, A. *et al.* (2009a). *Leishmania* survey on cats from a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. In *Proceedings of the 4th World Leish Congress, Lucknow, India*, pp. 267.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2009b). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179 (1), 142 - 144.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174, 336 - 340.

- Maia, C. & Campino, L. (2011a). A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. *Veterinary Medicine*, 13 (76), 46 - 49.
- Maia, C. & Campino, L. (2011b). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. *Trends in Parasitology*, 27 (8), 341 - 344.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L. & Campino, L. (2014). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 7, 1 – 8.
- Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?. *Parassitologia*, 46 (1-2), 203 - 206 (resumo online). Acedido a 23 de Outubro de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305717>.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N. & Gravino, A.E. (2004). Comparison of diferente tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 125, 251 – 262.
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A., Montenegro, L. & Roccabianca, P. (2009). Case report: pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis, *Veterinary Clinical Pathology*, 38 (2), 1 - 5.
- Marechal, M. (1993). *La leishmaniose feline: cas sporadique ou realité encore ignorée? (etude dans la region Marseillaise)*. These – Ecole National Vétérinaire de Lyon.
- Maroli, M., Pennisi, M., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), 357 - 360.
- Maroli, M., Jalouk, L., Al Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C. & Gradoni, L. (2009). Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo governorate, Syria. *Medical and Veterinary Entomology*, 23 (2), 148 - 154.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 123 – 147.
- Martins, T.S.O. (2011). *Deteção de Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., Mycoplasma haemofelis e Leishmania infantum em felinos errantes e sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Marques, C.S., Santos, M.F., Pomba, C., Gomes, L., Duarte, A., Meireles, J., Tavares, L., Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I. (2013). Detection of *Leishmania* infection in cats by qPCR of blood and conjunctival swabs and by indirect immunofluorescence assay [Abstract]. In *Proceedings of the 5th World Leish Congress, Porto de Galinhas, Brazil, 13 – 17 May*, pp. 242.

- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O. & Altet, L. (2011). Canine leishmaniasis: the key point for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors*, 4, 1 – 5.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Mehlhorn, H. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4), 267 - 273.
- Massucci, M., De Majo, M., Contarino, R.B., Borruto, G., Vitale, F. & Pennisi, M.G. (2003). Canine leishmaniosis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, 27, 771 – 774.
- Maurício, I.L., Stothard, J.R. & Miles, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16 (5), 188 – 189.
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M., *Leishmaniose canina*. (pp. 93-99). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. & Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, 90, 108 – 111.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. & Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5515 – 5519.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, F., a-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L. & Dias, E.S., (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, 147, 67 - 76.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N. & Ferroglio, E. (2011). An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 352 – 357.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24 (8), 371 - 377.
- Miró, G., Hernández, L., Montoya, A., Arranz-Sous, D., Dado, D., Rojo-Montejo, S., Mendoza-Ibarra, J.A., Ortega-Mora, L.M. & Pedraza-Díaz, S. (2011). First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a persian cattery in Spain. *Parasitology Research*, 109, 1151 - 1154.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V. & Montoya, A. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis?. *Parasites & Vectors*, 7 (112), 1 – 7.

- Molina, R., Miró, G., Galvez, R., Neto, J. & Descalzo, M.A. (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Record*, 159, 206 – 209.
- Moreira, M., Luvizotto, M., Garcia, J., Corbett, C. & Laurenti, M. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145, 245 – 252.
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18 (9), 399 – 405.
- Moreno, A.M., Nieto, C.G. & Rodríguez, S.H. (2002). Capítulo 36: leishmaniosis canina. In M.C. Del Campillo & F.A.R. Vázquez, *Parasitologia Veterinária*. (3ª ed.). (pp.652 – 656). Madrid, Espanha: McGraw-Hill – Interamericana de España, S.A.U.
- Morosetti, G., Bongiorno, G., Beran, B., Scalone, A., Moser, J., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Maroli, M. (2009). Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospatial Health*, 4, 115 – 127.
- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti, F., Bazzocchi, C., Genchi, C. & Bandi, C. (2004). Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania* (Resumo online). *Parassitologia*, 46 (1-2), 163 – 167. Acedido a 20 de Novembro de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305709>
- Nasereddin, A., Salant, H. & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Veterinary Parasitology*, 158, 364 – 369.
- Navarro, J., Sánchez, J., Penafiel-Verdú, C., Buendia, A., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 cats with Leishmaniose. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 297 – 302.
- Neto, L.S., Sobrinho, L.S.V., Martins, C.O., Machado, R.Z., Marcondes, M. & Felix de Lima, V.M. (2011). Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology*, 177, 374 – 377.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T. & Milon, G. (2002). Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5), 1666 – 1669.
- Nishii, N., Takasu, M., Kojima, M., Hachisu, T., Wakabayashi, K., Iwasawa, A., Maeda, S., Ohba, Y. & Kitagawa, H. (2011). Presence of anti-insulin autoantibodies in healthy cats and its interference with immunoassay for serum insulin concentrations. *Domestic Animal Endocrinology*, 38, 138 – 145.
- Noli, C., Lloyd, D., Loeffler, A., Schwendenwein, I. & Meredith, A. (2006). Protozoal infections: canine leishmaniasis. In *Proceedings of Dermatology Course on the European School for Advanced Veterinary Studies, Luxembourg, 14 -18 August*, pp. 19 – 27. Acedido em 15 de Junho de 2014, disponível em: http://www.esavs.net/course_notes/dermatology2_06/cn_derm2_week2.pdf

- Noli, C. & Saridomichelakis, M. N. (2014). Na update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *The Veterinary Journal*, 202, 425 – 435.
- Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W. & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (10), 2877 – 2881.
- Ogusuku, E., Perez, J., Paz, L., Nieto, E., Monje, J. & Guerra, H. (1994). Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88, 329 - 335.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. & Gradoni, L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1318 - 1322.
- Oliveira, F., Jochim, R.C., Valenzuela, J.G. & Kamhawi, S. (2009). Sand flies, *Leishmania* and transcriptome-borne solutions. *Parasitology International*, 58, 1 – 5.
- Oliveira, A.M., Diaz, S., Santos, C., Bourdeau, P. & Pereira da Fonseca, I. (2010). Geographical distribution, clinical presentation, treatment and prevention of canine leishmaniosis in Portugal: a 2007 field survey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109, 21 – 29.
- Onleish (2011). *Observatório Nacional das Leishmanioses*. Acedido em 12 de Abril de 2014. Disponível em: <http://www.onleish.org/index.php>
- Organização Mundial de Saúde [OMS]. (2010). Control of the leishmaniasis: report of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis (versão online). Acedido a 7 de Junho de 2012, disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
- Organização Mundial de Saúde [OMS]. (2014a). Leishmaniasis: fact sheets (versão online). Acedido em 28 de Junho de 2014, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- Organização Mundial de Saúde [OMS]. (2014b). Leishmaniasis: leishmaniasis home (versão online). Acedido em 28 de Junho de 2014, disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Organização Mundial de Saúde [OMS]. (2014c). Leishmaniasis: situation and trends (versão online). Acedido em 28 de Junho de 2014, disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., De Caprariis, D., Di Paola, G., Tarallo, V.D., Latrofa, M.S., Lia, R.P., Annoscia, G., Breitschwerdt, E.B., Cantacessi, C., Capelli, G. & Stanneck, D. (2013). Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4,5% flumethrin. *PLoS One*, 8 (2), 1 – 8.

- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. & Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniosis through blood transfusion from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219, 1076 - 1083.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelièvre, A. & Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Veterinary Parasitology*, 75, 273 - 277.
- Ozon, C., Marty, P., Lelièvre, A., Biorgalli, J., Corniglion, A., Giamoco, A. & Lamothe, J. (1999). Le chat réservoir de *Leishmania infantum* dans le sud de la France?. In *Proceedings of the 24th WSAVA Congress, Lyon*, pp.35.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, M., Roura, X., Zatelli, A. & Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236 (11), 1184 – 1191.
- Paraguay De Souza, E., Esteves-Pereira, A.P., Machado, F.C., Melo, M.F., Souto-Padrón, T., Palatnik, M. & Palatnik-De-Sousa, C.B. (2001). Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. *Acta Tropica*, 80, 69 - 75.
- Pennisi, M.G., Masucci, M. & De Majo, M. (1994). Presenza di anticorpi anti-nucleo in gatti FIV positivi. *Atti Convegno Nazionale Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 48, 973 – 976.
- Pennisi, M.G., Maxia, L., Vitale, F., Masucci, M., Borruto, G., Caracappa, S. (2000). Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. *Atti Convegno Nazionale della Società Italiana di Scienze Veterinarie*, 54, 215 – 216.
- Pennisi, M.G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, Sevilla, Spain*, pp. 39 – 48.
- Pennisi, M.G., Venza, M., Reale, S., Vitale, F. & Lo Giudice, S. (2004). Case report of leishmaniasis in four cats. *Veterinary Research Communications*, 28, 363 – 366.
- Pennisi, M.G. (2010). Feline leishmaniosis from A to Z [in Italian]. In *Proceedings of the 2nd International Congress on Canine Leishmaniasis, Pisa, Italy, 17 – 18 April*, pp. 72 – 76.
- Pennisi, M.G., Lupo, T., Malara, D., Masucci, M., Migliazzo, A. & Lombardo, G. (2012). Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from southern Italy [abstract]. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14, 656 - 657.
- Pennisi, M.G. (2013). An update on feline leishmaniasis in Europe. *European Journal of Companion Animal Practice*, 23 (2), 20 – 27.
- Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2013).

Leishmaniosis in cats – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 638 – 642.

Pennisi, M.G. & Solano-Gallego, L. (2013a). Capítulo 10: Leishmaniosis felina. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: Una revisión actualizada*. (pp. 185 – 204). Zaragoza, Espanha: Server editorial – Grupo Asís Biomedica S.L.

Pennisi, M.G. & Solano-Gallego, L. (2013b). Leishmaniosi felina: tra certezze e dubbi. In *Proceedings of the International SCIVAC Congress: Canine Leishmaniosis and Other Vector-Borne Diseases - Our Current State of Knowledge, Pisa, Itália, 8 – 10 March*, pp. 82 – 90.

Pennisi, M.G. (2014). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, 208 (1 – 2), 35 – 47.

Pereira, A.R. (2003). Geografia física e ambiente: diversidade do meio físico e recursos naturais. Tenedório, J.A. (2003). Atlas da Área Metropolitana de Lisboa. Acedido a 11 de Fevereiro de 2014, disponível em: http://www.aml.pt/~aml/app/webstatic/actividades/smig/atlas/_docs/atlas_04.pdf

Pereira, M.A.M. (2008). Capítulo III: epidemiologia da leishmaniose canina. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 41 – 9). Lisboa, Portugal: Chaves Ferreira – Publicações S.A.

Pereira da Fonseca, I.M. & Santos-Gomes, G.M. (2008). Capítulo VIII: Perspectivas futuras. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 105 – 110). Lisboa, Portugal: Chaves Ferreira – Publicações S.A.

Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 83 – 92). Lisboa, Portugal: Chaves Ferreira – Publicações S.A.

Pereira da Fonseca, I., Saraiva-Marques, C., Basso, A. & Garrido, J. (2013). Leishmaniose felina. *Revista de Medicina Veterinária da Associação dos Estudantes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa*, 67, 15 – 25.

Perillo, L., Pennisi, M.G., Solano-Gallego, L., Lupo, T., Migliazzo, A. & Mazzulo, G. (2013). *Leishmania infantum* PCR positive lymph node aspirates: cytologic patterns in cats. In *Proceedings of the International SCIVAC Congress: Canine Leishmaniosis and Other Vector-Borne Diseases - Our Current State of Knowledge, Pisa, Itália, 8 – 10 March*, pp. 144 – 145.

Pestana, M.H. & Gageiro, J.N. (2003). *Análise de dados para ciências sociais – A complementaridade do SPSS* (3ª ed.). Lisboa: Edições Sílabo, Lda.

Peterson, C.A. (2009). Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the Unites States. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24, 182 – 188.

Petrie, A. & Watson, P. (2006). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. (2nd ed.). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.

- Pilatti, M.M., De Almeida Ferreira, S., Melo, M.N. & De Andrade, A.S.R. (2009). Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science*, 87, 255 – 257.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106, 181 – 191.
- Porrozzi, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A. & Grimaldi Jr., G. (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 544 – 548.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M. J., Fisa, R. & Castillejo, S. (2002). Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 62 (3 – 4), 72 – 76.
- Prina, E., Roux, E., Mattei, D. & Milon, G. (2007). *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection*, 9, 1307 - 1315.
- Puleio, R., Tamburello, A., Lupo, T., Migliazzo, A., Loria, G.R. & Pennisi, M.G. (2011). Aspetti istopatologici, immunoistochimici e molecolari in quattro casi di leishmaniose felina. In *Proceedings VIII Congresso nazionale AIPVet, Padova, Italy, 15 – 17 June*, pp. 87.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M.F., Ferreira, E.C., Da Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P. & Gontijo, C.M.F. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111, 289 – 294.
- Ramos, J.J., Sarasa, I., Ochia, P., Hernández, J. A., Salinas, M. J. & Amella, M.J. (2002). Serological evidence of leishmaniasis in cats in Aragón, Spain. In *Proceedings 27th WSAVA Congress, Granada, Spain*.
- Ramos, C.P.G. (2012). *A importância da infecção por Leishmania spp. e Dirofilaria immitis em gatos na região de Olhão*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ready, P.D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15 (10), 1 – 11.
- Ready, P.D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227 – 250.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C. & Davies, C.R. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2), 748 – 751.

- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Counihan, H., Espinoza, J.C., González, J.S. & Davies, C.R. (2002). *Leishmania (Viannia) spp.* dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 76 – 78.
- Richter, M., Schaarschmidt-Kiener, D. & Krudewig, C. (2014). Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 156 (6), 289 – 294.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Francino, O., López-Fuertes, L., Timón, M. & Alberola, J. (2010). *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 82 (2), 251 – 256.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todoli, F. & Alberola, J. (2013). Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 191, 363 – 366.
- Rosa, N.J.G.C. (2009). *Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rosypal, A.C., Zajac, A.M. & Lindsay, D.S. (2003). Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33, 921 – 937.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G. & Lindsay, D.S. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, 91, 970 – 972.
- Roura, L.X. (2007). Diagnóstico de leishmanioses. *Livro de Ponencias Southern European Veterinary Conference, 42, Congresso Nacional AVEPA*, 253 – 255.
- Roze, M. (2005). Canine leishmaniasis – a spreading disease. Diagnosis and treatment. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 15 (1), 39 – 52.
- Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M.M. & Roosje, P.J. (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 156, 542 - 545.
- Sanches, A., Cardoso, C., Pereira, A. & Carvalho, J. (2009). Um caso de leishmaniose felina. *In Proceedings of the 18th APMVEAC Congress, Lisbon, Portugal*.
- Santos, M., Marcos, R., Assunção, M., Matos, A.J. (2006). Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology*, 141, 340 - 344.
- Santos, J.P.G.A.B. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Santos-Gomes, G.M., Rodrigues, O.R., Marques, C. (2008). Capítulo 5: Resposta imunológica. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 69 – 80). Lisboa, Portugal: Chaves Ferreira – Publicações S.A.

- Saz, S.V., Esteve, L.O. & Solano-Gallego, L. (2013). Capítulo 3: Patogénesis y respuesta inmunitaria. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: una revisión actualizada*. (pp. 33 – 51). Zaragoza, Espanha: Server editorial – Grupo Asís Biomedia S.L.
- Schantz, P.M., Steurer, F.J., Duprey, Z.H., Kurpel, K.P., Barr, S.C., Jackson, J.E., Breitschwerdt, E.B., Levy, M.G. & Fox, J.C. (2005). Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 1316 - 1322.
- Sergent, E., Lombard, J. & Quilichini, M. (1912). La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5, 93 – 98.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne Disease*, 45, 255 – 272.
- Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2011). Serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the island of Ibiza (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11 (3), 239 – 245.
- Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Kusi, I., Shukullari, E., Hamel, D., Pfister, K. & Rehbein, S. (2014). Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasites & Vectors*, 7 (62), 1 – 10.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55 – 59.
- Silva, S. M., Rabelo, P.F.B., Gontijo, N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M. & Michalick, M.S.M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 174, 150 – 154.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua, C.M.L., Prata-Júnior, R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coêlho, Z.C.B., Coêlho, I.C.B., Barral, A. & Pompeu, M.M.L. (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 127, 199 – 208.
- Sobrinho, L.S.V., Rossi, C.N., Vides, J.P., Braga, E.T., Gomes, A.A.D., Lima, V.M.F., Perri, S.H.V., Generoso, D., Langoni, H., Leutenegger, C., Biondo, A.W., Laurenti, M.D. & Marcondes, M. (2012). Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 187, 302 – 306.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 560 - 563.

- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76 (4), 676 – 680.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*, 18, 232 – 241.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1–18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4 (86), 1 – 16.
- Solano-Gallego, L. & Saz, S.V. (2013). Capítulo 7: Diagnóstico. In L. Solano-Gallego *et al.*, *Leishmaniosis: una revisión actualizada*. (pp. 131 – 150). Zaragoza, España: Server editorial – Grupo Asís Biomedica S.L.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T. & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan[®], ID Screen[®] and *Leishmania* 96[®]), a rapid test (Speed Leish K[®]) and an in-house IFAT. *Parasite & Vectors*, 7, 1 – 10.
- Spada, E., Proverbio, D., Migliazzo, A., Pepa, A.D., Perego, R. & De Giorgi, G.B. (2013). Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a nonendemic area in northern Italy. *International Scholarly Research Notices Parasitology*, 1 – 6.
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R. & Salotra, P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, 110, 1065 – 1078.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L. & Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 1729 – 1733.
- Sundar, S. & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9 (5), 951 – 958.
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2008a). Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, 151, 332 – 336.
- Tabar, M.D., Roura, X., Francino, O., Altet, L. & Ruiz de Gopegui, R. (2008b). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 325 – 328.

- Tafuri, W.L., Santos, R.L., Arantes, R.M., Gonçalves, R., De Melo, M.N. & Michalick, M.S. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, 292, 17 – 23.
- Thrusfield, M. (2007). *Veterinary Epidemiology*. (3th ed.). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Tomás, A.M. & Romão, S.F. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose canina*. (pp. 7 – 23). Lisboa, Portugal: Chaves Ferreira – Publicações S.A.
- Trainor, K.E., Porter, B.F., Logan, K.S., Hoffman, R.J. & Snowden, K.F. (2010). Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Veterinary Pathology*, 47, 1076–1081.
- Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Fazendeiro, M. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 33 (129 - 130), 9 - 10.
- Venet, B. (2007). La leishmaniose feline: despitage en region toulonnaise. *Thèse n° 99*. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- Veronesi, F., Moretta, I., Vitale, F., Lupo, T., Migliazzo, A. *et al.* (2010). *Leishmania infantum*: serological and molecular investigation in cats from Ischia island (southern Italy). In *Proceedings 2nd International Congress on Canine Leishmaniosis*, Pisa, pp. 169 – 171.
- Verneuil, M. (2006). Feline ocular leishmaniasis: an underdiagnosed disease?. In *Proceedings of the European College of Veterinary Ophthalmologists and of the European Society of Veterinary Ophthalmology*, Brugge Belgium, 10 - 14 May.
- Vides, J.P., Schwardt, T.F., Sobrinho, L.S., Marinho, M., Laurenti, M.D., Biondo, A.W., Leutenegger, C. & Marcondes, M. (2011). *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 178, 22 - 28.
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, V.L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J. & Silvestre-Ferreira, A.C. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6, 1 – 6.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E., Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Veterinary Research Communications*, 29, 319 – 321.
- Volf, P., Hostomska, J., & Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15, 237 – 243.
- Wall, R., Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control*. (2th ed.). London: Blackwell Science Ltd.

- Wardrop, K.J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C. & Lappin, M.R. (2005). Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 135 – 142.
- Weirather, J.L., Jeronimo, S.M.B., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M.A., Haque, R., Schriefer, A., Talhari, S., Carvalho, E.M., Donelson, J.E. & Wilson, M.E. (2011). Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (11), 3892 – 3904.
- Wylie, C.E. (2013). Clinically relevant advances in european canine leishmaniosis. *Companion Animal*, 18 (9), 422 – 427.

VI – ANEXOS

Anexo I - Seroprevalências obtidas em estudos epidemiológicos na Europa (2000 – 2013)

(Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

País	Técnica serológica (limiar de positividade utilizado)	Nº total de gatos examinados	Seroprevalência (%)	Referência
Albânia	IFI (1:64)	146	0,7	Silaghi <i>et al.</i> , 2014
Espanha	ELISA-proteína A	117	1,7	Portús <i>et al.</i> , 2002
	TAD (1:800)	50	42,0	Ramos <i>et al.</i> , 2002
	ELISA-proteína A	445	6,3	Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2007
	ELISA-IgG	445	5,3	
	IFI (1:40)	180	28,3	Martín-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
	IFI (1:50)	233	4,3	Ayllón <i>et al.</i> , 2008
	WB	86	16,0	Millán <i>et al.</i> , 2011
	IFI (1:100)	20	15,0	Miró <i>et al.</i> , 2011
	ELISA-IgG	105	13,2	Sherry <i>et al.</i> , 2011
	IFI (1:50)	680	3,7	Ayllón <i>et al.</i> , 2011
	IFI (1:100)	346	3,2	Miró <i>et al.</i> , 2014
França	IFI (1:50)	26	38,0	Venet, 2007
Grécia	IFI (1:64)	389	21,6	Huebner <i>et al.</i> , 2008
	ELISA-IgG	284	3,87	Diakou <i>et al.</i> , 2009
Itália	IFI (1:20)	89	68,5	Pennisi <i>et al.</i> , 2000
	IFI (1:40)	110	0,9	Poli <i>et al.</i> , 2002
	IFI (1:40)	203	16,3	Vita <i>et al.</i> , 2005
	IFI (1:40)	95	9,5	Veronesi <i>et al.</i> , 2010
	IFI (1:80)	419	6,9	Pennisi <i>et al.</i> , 2012
	IFI (1:40, 1:80, 1:160)	233	25,3	Spada <i>et al.</i> , 2013
Portugal	IFI	97	1,03	Vaz <i>et al.</i> , 2005
	IFI (1:80)	75	0,0	Faria, 2008
	IFI (1:2)	20	20,0	Maia <i>et al.</i> , 2008
	IFI (1:40 e 1:80)	70	0,0	Rosa, 2009
	TAD (1:100)	316	1,9	Cardoso <i>et al.</i> , 2010
	ELISA-IgG	316	2,8	
	IFI (1:40)	180	0,6	Duarte <i>et al.</i> , 2010
	IFI (1:2)	76	1,3	Maia <i>et al.</i> , 2010
	IFI (1:40)	40	12,5	Garrido, 2012
	TAD (1:100, 1:200, 1:800)	215	4,2	Ramos, 2012
	IFI (1:80)	39	17,95	Marques <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ELISA - Ensaio Imunoenzimático; IFI - Imunofluorescência Indireta; TAD - Teste de Aglutinação Direta; WB - *Western Blot*.

Anexo II - Prevalências obtidas em estudos epidemiológicos, através da técnica de PCR, na Europa (2000 - 2013) (Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

País	Amostra utilizada	Nº total de gatos examinados	Prevalência (%)	Referência
Albânia	S	146	0,0	Silaghi <i>et al.</i> , 2014
Espanha	S	80	25,7	Martín-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
	S	233	0,4	Ayllón <i>et al.</i> , 2008
	S	100	3,0	Tabar <i>et al.</i> , 2008b
	S	86	26,0	Millán <i>et al.</i> , 2011
	S	104	8,7	Sherry <i>et al.</i> , 2011
	S	680	0,6	Ayllón <i>et al.</i> , 2011
	S	346	0,0	Miró <i>et al.</i> , 2014
	S	26	0,0	Venet, 2007
França	S	26	0,0	Venet, 2007
	S	100	13,0	Chatzis <i>et al.</i> , 2014
	CC	100	3,1	
	MO	100	16,0	
	Pele	100	18,2	
Itália	S	89	60,7	Pennisi <i>et al.</i> , 2000
	S	95	5,3	Veronesi <i>et al.</i> , 2010
	MO	95	0,0	
	S	203	7,8	Pennisi <i>et al.</i> , 2012
	Linfonodo	154	11,7	
	CC	66	16,7	
	S	233	0,0	Spada <i>et al.</i> , 2013
	S	23	30,4	Maia <i>et al.</i> , 2008
Portugal	S	150	18,7	Maia <i>et al.</i> , 2009a
	S	138	20,3	Maia <i>et al.</i> , 2010
	S	50	2,0	Martins, 2011
	S	40	10,0	Garrido, 2012
	S	217	0,5	Ramos, 2012
	S	40	5,0	Marques <i>et al.</i> , 2013
	CC	39	23,0	
	S	320	0,3	Vilhena <i>et al.</i> , 2013
	S	649	9,9	Maia <i>et al.</i> , 2014

Legenda: MO – Medula Óssea; S – Sangue; CC – Células Conjuntivais.

Anexo III - Lista de posologias, a sua eficácia e efeitos secundários reportados em gatos com LFel (Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Referência	Posologia	Eficácia	Efeitos secundários	Seguimento
Denuzière (1977)	Isotionato de Pentamidina, IM, 12 injeções (posologia não comunicada).	Cura clínica rápida.	Nenhum.	Não comunicado.
Costa-Durão <i>et al.</i> (1994)	Antimoniato de meglumina, 1,25ml/gato, IM, QUOD, 55 dias.	Normalização da ALT durante o tratamento.	Nenhum.	Não comunicado.
Hervás <i>et al.</i> (1999)	Antimoniato de meglumina, 5mg/kg, SC, SID e cetoconazol 10mg/kg, PO. Ambos durante 3 ciclos de 4 semanas cada, com intervalo de 10 dias entre cada período.	Resolução das lesões dermatológicas.	Não comunicado.	Não comunicado.
Pennisi (2002); Pennisi <i>et al.</i> (2004)	Fluconazol 5mg/kg, PO, SID, 2 meses. Metronidazol (25mg/kg) e Espiramicina (150.000UI/kg), PO, SID, 35 dias. Itraconazol 50mg/gato, PO, SID, 2 meses.	Falta de eficácia sob qualquer posologia.	Nenhum.	Proteinúria descoberta 5 meses depois do diagnóstico e eutanásia 22 meses depois do diagnóstico devido a IRC em fase terminal.
Pennisi (2002); Pennisi <i>et al.</i> (2004); dados não publicados	Alopurinol 20mg/kg, PO, SID, 15 meses. Tratamento de apoio durante 1-5 meses.	Rápida melhoria clínica. IFI < 1:20 depois de 10 meses.	Nenhum.	Seroconversão 2 meses depois de interromper o tratamento, seguida de recorrência clínica tratada de novo com alopurinol. Morte 32 meses depois do diagnóstico devido a uma IRC.

Legenda: ALT: alanina aminotransferase; IFI: Imunofluorescência Indireta; IM: via intramuscular; IRC: Insuficiência Renal Crónica; PO: *per os*; QUOD: dia sim, dia não; SC: via subcutânea; SID: uma vez ao dia.

Anexo III (continuação) – Lista de posologias, a sua eficácia e efeitos secundários reportados em gatos com LFel (Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Referência	Posologia	Eficácia	Efeitos secundários	Seguimento
Maroli <i>et al.</i> (2007); Pennisi, dados não publicados	Alopurinol 20mg/kg, PO, SID. Metilprednisolona aplicada 4 anos devido a uma gengivostomatite crónica.	IFI 1:20 depois de 11 semanas.	Alopurinol interrompido depois de 11 semanas devido a uma IRA.	Eutanásia 8 meses mais tarde por IRC e insuficiência cardíaca devida a cardiomiopatia hipertrófica.
Britti <i>et al.</i> (2005)	Alopurinol 15mg/kg, PO, BID. Tratamento de suporte.	Agravamento do estado clínico.	-	Eutanásia após 15 dias.
Leiva <i>et al.</i> (2005)	Enucleação dos 2 olhos afectados. Alopurinol 10mg/kg, PO, BID, 6 meses.	Bom estado clínico e diminuição do título depois de 3 meses.	Não comunicado.	Aumento do título 3 meses depois da interrupção do tratamento.
Rüfenacht <i>et al.</i> (2005)	Excisão nodular seguida de recorrência. Alopurinol 10mg/kg, PO, BID (reduzido para 5mg/kg depois de 3 meses devido a efeitos secundários), 15 meses.	Cura lenta das lesões cutâneas (6 meses depois de começo o alopurinol).	Aumento das enzimas hepáticas.	43 meses: serologia negativa e globulinas dentro dos valores de referência.
Rüfenacht <i>et al.</i> (2005)	Prednisolona devido a pênfigo foliáceo concorrente. Alopurinol 10mg/kg, PO, BID.	Cura dermatológica após 10 semanas de alopurinol.	Não comunicado.	24 meses: necessidade esporádica de tratamento tópico com corticóides.

Legenda: BID: duas vezes ao dia; IFI: Imunofluorescência Indireta; IRA: Insuficiência Renal Aguda; IRC: Insuficiência Renal Crónica; PO: *per os*; SID: uma vez ao dia.

Anexo III (continuação) – Lista de posologias, a sua eficácia e efeitos secundários reportados em gatos com LFel (Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Referência	Posologia	Eficácia	Efeitos secundários	Seguimento
Monteverde <i>et al.</i> (2006)	Alopurinol 20mg/kg, PO, SID, 20 dias, seguido de antimoniato de meglumina 20mg/kg, SC, SID, 20 dias.	Agravamento clínico da lesão cutânea.	Não comunicado.	Não comunicado.
Marcos <i>et al.</i> (2009)	Transfusão de sangue e nandrolona. Alopurinol 10mg/kg, PO, BID.	Agravamento do estado clínico.	-	Eutanásia após 20 dias.
Ibba (2009)	Antimoniato de meglumina 50mg/kg, SID, 30 dias. Tratamento de apoio e antibiótico.	Cura clínica rápida.	Não comunicado.	Morte não relacionada com a doença 15 dias depois do fim do tratamento.
Sanches <i>et al.</i> (2011)	Alopurinol 10mg/kg, PO, BID. Moxidectina + imidaclopride para demodectose concorrente. Colírio de prednisolona, neomicina e polimicina B para uveíte.	Melhoria clínica.	Não comunicado.	As lesões cutâneas melhoraram depois de 2 semanas.
Pocholle <i>et al.</i> (2012)	Excisão cirúrgica de um carcinoma de células escamosas. Alopurinol 100mg/gato, PO, SID até à cura.	Cura clínica observada depois de 4 meses.	Não comunicado.	Morte não relacionada com a doença 7 meses depois do diagnóstico.

Legenda: BID: duas vezes ao dia; PO: *per os*; SID: uma vez ao dia.

Anexo III (continuação) – Lista de posologias, a sua eficácia e efeitos secundários reportados em gatos com LFel (Adaptado de Pennisi & Solano-Gallego, 2013a).

Referência	Posologia	Eficácia	Efeitos secundários	Seguimento
Ennas <i>et al.</i> (2012)	Alopurinol 20mg/kg, PO, SID. Tratamento de apoio.	Melhoria clínica.	Não comunicado	Morte depois de 2 meses (causa não investigada).
Pennisi, dados não publicados	Alopurinol 100mg/gato, PO, SID.	-	IRA diagnosticada 2 semanas depois do início do tratamento.	Tratamento interrompido passados 15 dias. Morte comunicada uns meses depois do tratamento (causa não investigada).
Pennisi, dados não publicados	Alopurinol 25mg/gato, PO, BID.	Melhoria clínica.	Não comunicado	Morte 3 meses depois do início do tratamento (causa não investigada).
Basso <i>et al.</i> (2013)	Alopurinol 10mg/kg, PO, BID. Antimoniato de meglumina 50mg/kg, SID, 30 dias.	Cura clínica de lesões nodulares nas orelhas e cabeça.	Não observados	Remissão completa das lesões, redução da carga parasitária e seroconversão.
Richter <i>et al.</i> (2014)	Alopurinol 10mg/kg, PO, BID.	Rápida melhoria dos sinais oculares, da condição geral e do hemograma.	-	Remissão completa das lesões na córnea após 2 meses de tratamento.

Legenda: BID: duas vezes ao dia; IRA: Insuficiência Renal Aguda; PO: *per os*; SID: uma vez ao dia.

Anexo IV - Principais espécies de *Leishmania*, tipo de doença causada no Homem e a sua distribuição geográfica (Adaptado de Ashford, 2000; Bates, 2007; Tomás & Romão, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

	Espécie de <i>Leishmania</i>	Doença clínica no Homem	Distribuição geográfica
Velho Mundo	<i>L. (L.) infantum</i> ^a	LV, LC	Bacia do Mediterrâneo Ásia central e oeste da Ásia
	<i>L. (L.) donovani</i>	LV, LDPK	África oriental Subcontinente Indiano
	<i>L. (L.) major</i>	LC	Norte, centro e oeste de África Ásia central e oeste da Ásia
	<i>L. (L.) tropica</i>	LC	Norte de África Ásia central e oeste da Ásia
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	LC, LCD	Etiópia e Quênia
Novo Mundo	<i>L. (L.) chagasi</i> ^a	LV, LC	América do sul e central
	<i>L. (L.) amazonensis</i> ^a	LC, LCD	América do sul, principalmente norte da Amazónia
	<i>L. (L.) mexicana</i> ^a	LC, LCD	América central
	<i>L. (V.) braziliensis</i> ^a	LC, LMC	América do sul e central
	<i>L. (V.) panamensis</i>	LC, LMC	América central
	<i>L. (V.) peruviana</i>	LC	Andes peruanos
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	LC	Guiana francesa

Legenda: a – espécies já encontradas em gatos; *L.* – *Leishmania*; LC – Leishmaniose Cutânea; LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa; LDPK – Leishmaniose Dérmica Pós-*Kala-Azar*; LMC – Leishmaniose Mucocutânea; LV – Leishmaniose Visceral; *V.* – *Viannia*.

Anexo V - Inquérito realizado aos proprietários dos felinos domésticos assistidos no Hospital Veterinário VetOeiras

Estágio MIMV Patrícia Inês Santos Gomes - Hospital Veterinário VetOeiras

Inquérito no âmbito do tema da dissertação de mestrado
“Deteção da infeção por *Leishmania* spp., em gatos da Área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue”



Nome do animal: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: Feminino ☐ Masculino ☐

Raça: _____

Tipo de pelagem: Curta ☐ Média ☐ Comprida ☐

Nome do proprietário: _____ Telefone: _____

E-mail: _____

1. O seu gato está esterilizado?
 - a. Sim
 - b. Não
2. Há quanto tempo está com o proprietário?
3. Onde vive o seu gato?
 - a. Interior
 - b. Exterior
 - c. Misto
4. Cidade onde habita?
5. Tem acesso à rua?
 - a. Sim
 - b. Não
- 5.1. Se sim, em que alturas do dia?
 - a. De manhã
 - b. De tarde
 - c. À noite
 - d. Sempre

6. O seu gato dorme dentro de casa?

- a. Sim
- b. Não

6.1. Se não, onde?

7. Coabita com outros animais?

- a. Sim
- b. Não

7.1. Se sim, qual ou quais?

- a. Cão de casa
- b. Gato de casa
- c. Gatos de rua
- d. Outros, quais?

7.2 Se coabita com um ou mais cães, algum deles tem leishmaniose?

- a. Sim
- b. Não

8. O gato costuma viajar por Portugal?

- a. Sim
- b. Não

8.1 Se sim, para onde se costumam deslocar?

- a. Cidade
- b. Campo
- c. Praia

8.2 Em que altura do ano?

9. O gato costuma viajar pelo estrangeiro?

- a. Sim
- b. Não

9.1 Se sim, para onde se costumam deslocar?

- a. Cidade
- b. Campo
- c. Praia

9.2 Em que altura do ano?

10. É administrado algum tipo de desparasitação externa?

- a. Sim
- b. Não

10.1. Se sim, com que frequência?

- 10.2. E qual o produto que utiliza?
- 10.3 Se não, porquê?
- a. Razões económicas
 - b. Animal de apartamento
 - c. Outras, quais?
11. O seu gato foi testado para FIV e FeLV?
- a. Sim
 - b. Não
- 11.1. Se sim, qual o resultado?
- a. Positivo a FeLV
 - b. Positivo a FIV
 - c. Positivo a ambos
 - d. Negativo a ambos
- 11.2 Se é negativo a ambos, fez a vacina contra o FeLV?
- a. Sim
 - b. Não
12. O seu gato tem a vacinação contra parvovírus, herpesvírus e calicivírus atualizada?
- a. Sim
 - b. Não
13. O seu gato sofre de alguma doença?
- a. Sim
 - b. Não
- 13.1. Se sim, qual ou quais?
- 13.2. Quando surgiram?
- 13.3. Está a tomar alguma medicação? Qual?
14. O seu animal apresenta algum dos seguintes sinais?
- a. Nódulos
 - b. Feridas de difícil cicatrização
 - c. Emagrecimento sem causa aparente
 - d. Falta de pêlo na região da cabeça ou pescoço
 - e. Seborreia
 - f. Descamação
 - g. Eritema
 - h. Outros, quais?
 - i. Não apresenta nenhum destes sinais

Muito Obrigada

Patrícia Gomes

Anexo VI - Inquérito realizado no Gatil do Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira.

Estágio MIMV Patrícia Inês Santos Gomes – Gatil Centro de Recolha Oficial de Vila Franca de Xira

Inquérito no âmbito do tema da dissertação de mestrado “Deteção da infeção por *Leishmania* spp., em gatos da Área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue”



Nome do animal: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: Feminino ☐ Masculino ☐

Raça: _____

Tipo de pelagem: Curta ☐ Média ☐ Comprida ☐

Telefone: _____

E-mail: _____

1. O gato está esterilizado?
 - a. Sim
 - b. Não
2. Desde quando está no gatil?
3. Onde vive o gato?
 - a. Interior
 - b. Exterior
 - c. Misto
4. Tem acesso à rua?
 - a. Sim
 - b. Não
 - 4.1. Se sim, em que alturas do dia?
 - a. De manhã
 - b. De tarde
 - c. À noite
 - d. Sempre
5. Onde dorme?
 - a. Dentro do gatil
 - b. Na rua
 - c. Outro, qual?

6. Para além de outros gatos, coabita com outros animais?
 - a. Sim
 - b. Não
- 6.1. Se sim, qual ou quais?
 - a. Gatos da rua
 - b. Cães do canil
 - d. Outros, quais?
7. É administrado algum tipo de desparasitação externa?
 - a. Sim
 - b. Não
- 7.1. Se sim, com que frequência?
- 7.2. E qual o produto que utiliza?
8. O gato foi testado para FIV e FeLV?
 - a. Sim
 - b. Não
- 8.1. Se sim, qual o resultado?
 - a. Positivo a FeLV
 - b. Positivo a FIV
 - c. Positivo a ambos
 - d. Negativo a ambos
- 8.2 Se é negativo a ambos, fez a vacina contra o FeLV?
 - a. Sim
 - b. Não
9. O gato tem a vacinação contra parvovírus, herpesvírus e calicivírus atualizada?
 - a. Sim
 - b. Não
10. O gato sofre de alguma doença?
 - a. Sim
 - b. Não
- 10.1. Se sim, qual?
- 10.2. Quando surgiram?
- 10.3. Está a tomar alguma medicação? Qual ou quais?

11. Apresenta algum dos seguintes sinais?
- a. Nódulos
 - b. Feridas de difícil cicatrização
 - c. Emagrecimento sem causa aparente
 - d. Falta de pêlo na região da cabeça ou pescoço
 - e. Seborreia
 - f. Descamação
 - g. Eritema
 - h. Outros, quais?
 - i. Não apresenta nenhum destes sinais

Muito Obrigada

Patrícia Gomes

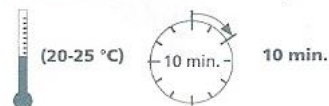
Anexo VII - Procedimento do ensaio do kit LEISCAN[®] *Leishmania* ELISA Test.

Retirar a película protectora que cobre os poços apenas quando estes vão ser utilizados.
Deitar 100 µl da amostra diluída ou controlo em cada poço. Agitar suavemente 15 segundos.
Em todos os casos recomenda-se utilizar no mínimo um controlo num poço para verificar a validade dos resultados do ensaio.

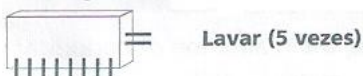
Soro diluído e controlos



Incubar 10 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).



Eliminar o conteúdo dos poços e lavar 5 vezes com aproximadamente 300 µl poço de solução de lavagem diluída.



Juntar 100 µl de conjugado (frasco N° 2) a cada poço. Agitar suavemente 15 segundos.



Incubar 5 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).



Eliminar o conteúdo dos poços e lavar 5 vezes com aproximadamente 300 µl poço de solução de lavagem diluída.



Juntar 100 µl de Substrato (frasco N° 3) a cada poço. Agitar suavemente 10 segundos.



Incubar 10 minutos **no escuro** à temperatura ambiente (20-25 °C).



Juntar 100 µl de Solução de Paragem (frasco N° 4) a cada poço.



Ler as densidades ópticas num leitor ELISA com um filtro de 450 nm.



Anexo VIII - Protocolo da técnica de IFI (kit *Leishmania* Spot IFI[®], Laboratório BioMérieux) adaptado.

1. Retirar a saqueta que contém as lâminas com antigénio (BioMérieux, França) do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 min.;
2. Preparar o tampão fosfato-salino (PBS) (BioMérieux, França), diluindo o conteúdo de um frasco em 1L de água destilada;
3. Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 0,5mL de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1L do preparado anterior e agitar muito bem;
4. Numa microplaca, depositar 195µL de PBS na coluna 1, num número de poços correspondente ao número de soros que se pretende testar;
5. Depositar 50µL de PBS no poço na coluna 2;
6. Depositar 5µL de cada soro no respetivo poço da coluna 1;
7. Com uma micropipeta contendo o volume de 50µL:
 - a. Fazer a diluição na coluna 1, obtendo a diluição 1:40;
 - b. Passar 50µL da coluna 1 para a coluna 2, obtendo a diluição 1:80 nos poços da coluna 2;
8. Com a micropipeta, retirar 10µL de cada poço da coluna 2 e colocar no respetivo poço da lâmina contendo o antigénio; no último poço de cada lâmina colocar 10µL de controlo positivo (soro de gato positivo) e seleccionar outro poço para colocar 10µL de controlo negativo (soro de gato negativo);
9. Incubar durante 30 min. a 37 °C, em câmara húmida;
10. Proceder à lavagem das lâminas:
 - a. 1.^a lavagem: mergulhar rapidamente as lâminas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - b. 2.^a lavagem: mergulhar as lâminas num recipiente contendo PBS/Tween 80, durante 5 min.;
 - c. 3.^a lavagem: mergulhar as lâminas num outro recipiente contendo PBS/Tween 80, durante 5 min.;
 - d. Lavar as lâminas com água destilada;
 - e. Deixar secar bem as lâminas.
11. Depositar 10µL do conjugado MegaScreen FLUO VET[®] (MegaCor Diagnostik GmbH; anticorpos anti-IgG total de gato) em cada poço, incluindo no dos controlos;
12. Incubar durante 30 min. a 37 °C em câmara húmida;
13. Lavagem igual ao passo 10;

14. Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem colocando uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep[®] (BioMérieux, França, Ref. 75 521) em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm;
15. Efectuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nm. A observação foi feita utilizando ocular 10x e objetiva 40x, numa ampliação total de 400x.

Anexo IX - Protocolo de extração de ADN do kit DNeasy Blood & Tissue Kit[®] (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha) adaptado.

1. Adicionar 20µL de proteinase K a 200µL da amostra;
2. Adicionar 200µL de tampão AL, vortexear e incubar a 56°C, durante 10 min.;
3. Adicionar 200µL de etanol (96 – 100%) e vortexear;
4. Pipetar a amostra para uma coluna DNeasy Mini, centrifugar 1 min. a 8000 rotações por minuto (rpm);
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 500µL de tampão AW1, centrifugar 1 min. a 8000 rpm;
6. Descartar o sobrenadante e adicionar 500µL de tampão AW2, centrifugar 1 min. a 8000 rpm;
7. Descartar o sobrenadante e centrifugar 3 min. a 13000 rpm;
8. Transferir a coluna para um tubo de centrifugação e adicionar 200µL de tampão AE no caso da amostra de sangue e 60µL no caso da amostra de células conjuntivais;
9. Centrifugar 1 min. a 8000 rpm;
10. Congelar a -20°C.

Anexo X - Resultados da técnica de ELISA sob a forma de razão da amostra (Rz), de acordo com a fórmula e tabela fornecidas pelo fabricante do kit LEISCAN[®] *Leishmania* ELISA Test.

$$\text{Razão da amostra (Rz)} = \frac{\text{D.O. da amostra}}{\text{D.O. do controlo positivo baixo}}$$

Razão (Rz)	Resultado	Equivalência IFI
Rz < 0,5	Negativo	Negativo
0,5 < Rz < 0,7	Negativo	1:20 a 1:40
0,7 < Rz < 0,9	Negativo	1:40 a 1:80
0,9 < Rz < 1,1	Duvidoso	1:80
1,1 < Rz < 1,5	Positivo Baixo	1:80 a 1:160
1,5 < Rz < 2	Positivo Alto	1:160 a 1:320
2 < Rz < 3	Positivo Alto	1:320 a 1:640
3 < Rz < 4	Positivo Muito Alto	1:640 a 1:1280
Rz > 4	Positivo Muito Alto	> 1:1280

Gato	Rz	Gato	Rz	Gato	Rz
1	0,121	17	0,290	35	0,141
2	0,154	18	0,139	36	0,208
3	0,187	19	0,161	37	0,132
4	0,395	20	0,138	38	0,084
5	0,250	21	0,196	39	0,167
6	0,429	22	0,134	40	0,123
7	0,228	23	0,146	41	0,087
8	0,219	25	0,209	43	0,164
9	0,152	26	0,293	44	0,157
10	0,194	27	0,155	45	0,131
11	0,225	28	0,140	46	0,120
12	0,243	29	0,184	47	0,141
13	0,156	30	0,128	48	0,137
14	0,167	31	0,385	49	0,155
15	0,168	32	0,146	50	0,099
16	0,192	34	0,215		

Anexo XI - Resultados da técnica de qPCR em CC, com o respetivo Ct médio, número de cópias por μL , número de cópias e número de parasitas na amostra biológica.

Gato	qPCR CC	Valor Ct médio	Nº de cópias/μL	Nº de cópias na amostra (60μL)	Nº de parasitas na amostra (60μL)
1	P	39,00	9,97	598	0,06
2	P	39,00	9,97	598	0,06
3	N	-	-	-	-
4	P	38,35	16,85	1011	0,10
5	N	-	-	-	-
6	N	-	-	-	-
7	N	-	-	-	-
8	N	-	-	-	-
9	N	-	-	-	-
10	N	-	-	-	-
11	P	38,02	19,79	1187	0,12
12	N	-	-	-	-
13	N	-	-	-	-
14	P	38,75	11,88	713	0,07
15	N	-	-	-	-
16	N	-	-	-	-
17	N	-	-	-	-
18	N	-	-	-	-
19	N	-	-	-	-
20	N	-	-	-	-
21	N	-	-	-	-
22	P	41,07	2,34	140	0,01
23	P	39,68	6,2	372	0,04
25	N	-	-	-	-
26	N	-	-	-	-
27	N	-	-	-	-
28	N	-	-	-	-

Legenda: CC: células conjuntivais; Ct: *Cycle threshold*; N: negativo; P: positivo.

Anexo XI (continuação) – Resultados da técnica de qPCR em CC, com o respetivo Ct médio, número de cópias por μL , número de cópias e número de parasitas na amostra biológica.

Gato	qPCR CC	Valor Ct médio	Nº de cópias/μL	Nº de cópias na amostra (60μL)	Nº de parasitas na amostra (60μL)
29	N	-	-	-	-
30	N	-	-	-	-
31	P	39,25	8,37	502	0,05
32	N	-	-	-	-
34	P	40,00	4,95	297	0,03
35	N	-	-	-	-
36	P	40,00	4,95	297	0,03
37	N	-	-	-	-
38	P	39,26	8,31	499	0,05
39	N	-	-	-	-
40	P	39,22	8,55	513	0,05
41	N	-	-	-	-
43	N	-	-	-	-
44	P	38,87	10,92	655	0,07
45	N	-	-	-	-
46	P	40,11	4,59	275	0,03
47	N	-	-	-	-
48	N	-	-	-	-
49	P	39,13	9,1	546	0,05
50	N	-	-	-	-

Legenda: CC: células conjuntivais; Ct: *Cycle threshold*; N: negativo; P: positivo.

Anexo XII - Resultados da técnica de qPCR em sangue, com o respetivo Ct médio, número de cópias por μ L e número de cópias na amostra e número de parasitas por mL de amostra biológica.

Gato	qPCR sangue	Valor Ct médio	Nº de cópias/μL	Nº de cópias na amostra (200μL)	≈ Nº de parasitas/mL
1	N	-	-	-	-
2	N	-	-	-	-
3	N	-	-	-	-
4	N	-	-	-	-
5	P	40,17	4,4	880	0,4
6	P	39,15	8,98	1796	0,9
7	N	-	-	-	-
8	P	39,31	8,03	1606	0,8
9	N	-	-	-	-
10	N	-	-	-	-
11	P	38,12	9,17	1834	0,9
12	P	39,71	6,07	1214	0,6
13	N	-	-	-	-
14	P	38,33	15,93	3186	1,6
15	N	-	-	-	-
16	N	-	-	-	-
17	N	-	-	-	-
18	N	-	-	-	-
19	N	-	-	-	-
20	P	39,22	8,55	1710	0,9
21	N	-	-	-	-
22	P	40,00	4,95	990	0,5
23	N	-	-	-	-
25	N	-	-	-	-
26	N	-	-	-	-
27	N	-	-	-	-

Legenda: ≈: aproximado; Ct: *Cycle threshold*; N: negativo; NA: não realizado; P: positivo.

Anexo XII (continuação) – Resultados da técnica de qPCR em sangue, com o respetivo Ct médio, número de cópias por μL , número de cópias na amostra e número de parasitas por mL de amostra biológica.

Gato	qPCR sangue	Valor Ct médio	Nº de cópias/μL	Nº de cópias na amostra (200μL)	\approx Nº de parasitas/mL
28	N	-	-	-	-
29	N	-	-	-	-
30	N	-	-	-	-
31	N	-	-	-	-
32	N	-	-	-	-
34	N	-	-	-	-
35	NA	-	-	-	-
36	NA	-	-	-	-
37	NA	-	-	-	-
38	NA	-	-	-	-
39	NA	-	-	-	-
40	NA	-	-	-	-
41	NA	-	-	-	-
43	NA	-	-	-	-
44	NA	-	-	-	-
45	NA	-	-	-	-
46	NA	-	-	-	-
47	NA	-	-	-	-
48	NA	-	-	-	-
49	NA	-	-	-	-
50	NA	-	-	-	-

Legenda: \approx : aproximado; Ct: *Cycle threshold*; N: negativo; NA: não realizado; P: positivo.

Anexo XIII - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC.

Fator de risco	Categoria	Amostra total (n=47)	qPCR CC positivo	qPCR CC negativo	Odds ratio	Valor p
Concelho	Amadora	4,3% (2)	0,0% (0)	100,0% (2)	-	0,48
	Cascais	31,9% (15)	33,3% (5)	66,7% (10)		
	Lisboa	2,1% (1)	100,0% (1)	0,0% (0)		
	Oeiras	27,7% (13)	23,1% (3)	76,9% (10)		
	Sintra	2,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
	Vila Franca de Xira	31,9% (15)	40,0% (6)	60,0% (9)		
Época de maior atividade do vetor	Sim	42,6% (20)	35,0% (7)	65,0% (13)	1,27	0,76
	Não	57,4% (27)	29,6 % (8)	70,4% (19)		
Sexo	Feminino	53,2% (25)	36,0% (9)	64,0% (16)	0,67	0,55
	Masculino	46,8% (22)	27,3% (6)	72,7% (16)		
Classes etárias	Jovem	42,5% (20)	35,0% (7)	65,0% (13)	-	0,59
	Adulto	27,7% (13)	38,5% (5)	61,5% (8)		
	Idoso	29,8% (14)	21,4% (3)	78,6% (11)		
Raça	EC	93,6% (44)	29,5% (13)	70,5% (31)	-	0,08
	Persa	4,3% (2)	100,0% (2)	0,0% (0)		
	Exótico	2,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
Tipo de pelagem	Curta	91,5% (43)	27,9% (12)	72,1% (31)	-	0,09
	Média	4,25% (2)	50,0% (1)	50,0% (1)		
	Comprida	4,25% (2)	100,0% (2)	0,0% (0)		
Origem	Doméstico	68,1% (32)	28,1% (9)	71,9% (23)	1,68	0,51
	Gatil	31,9% (15)	40,0% (6)	60,0% (9)		
Habitat	Interior	55,3% (26)	30,8% (8)	69,2% (18)	1,12	1
	Misto	44,7% (21)	33,3% (7)	66,7% (14)		
	Exterior	0,0% (0)	-	-		
Coabitação com cães infetados por <i>L. infantum</i>	Sim	34,0% (16)	43,8% (7)	56,2% (9)	2,20	0,32
	Não	66,0% (31)	25,8% (8)	74,2% (23)		

Anexo XIV (continuação) - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais clínicos com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em CC.

Fator de risco	Categoria	Amostra total (n=47)	qPCR CC positivo	qPCR CC negativo	Odds ratio	Valor p
Coabitação com cães saudáveis	Sim	10,6% (5)	20,0% (1)			
	Não	89,4% (42)	33,3% (14)	66,7% (28)	0,51	1
Profilaxia com ectoparasitídeos	Sim	51,1% (24)	37,5% (9)	62,5% (15)		
	Não	48,9% (23)	26,1% (6)	73,9% (17)	1,68	0,53
Presença de doença	Sim	29,8% (14)	28,6% (4)	71,4% (10)		
	Não	70,2% (33)	33,3% (11)	66,7% (22)	0,80	1
FIV	Positivo	4,3% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
	Negativo	95,7% (22)	31,8% (7)	68,2% (15)	0	1
	NA	51,1% (24)	-	-		
FeLV	Positivo	8,7% (2)	100,0% (2)	0,0% (0)		
	Negativo	91,3% (21)	23,8% (5)	76,2% (16)	∞	0,08
	NA	51,1% (24)	-	-		
Sinais clínicos compatíveis com LFel	Sim	12,8% (6)	33,3% (2)	66,7% (4)		
	Não	87,2% (41)	31,7% (13)	68,3% (28)	1,08	1

Anexo XV - Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais compatíveis com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em sangue.

Fator de risco	Categoria	Amostra total (n=32)	qPCR sangue positivo	qPCR sangue negativo	Odds ratio	Valor p
Concelho	Amadora	6,3% (2)	0,0% (0)	100,0% (2)	-	1
	Cascais	46,9% (15)	26,7% (4)	73,3% (11)		
	Lisboa	3,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
	Oeiras	40,6% (13)	30,8% (4)	69,2% (9)		
	Sintra	3,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
	Vila Franca de Xira	0,0% (0)	-	-		
Época de maior atividade do vetor	Sim	34,4% (11)	36,4% (4)	63,6% (7)	2,36	0,40
	Não	65,6% (21)	19,0% (4)	81,0% (17)		
Sexo	Feminino	56,3% (18)	16,7% (3)	83,3% (15)	2,69	0,25
	Masculino	44,7% (14)	35,7% (5)	64,3% (9)		
Classes etárias	Jovem	50% (16)	25,0% (4)	75,0% (12)	-	0,30
	Adulto	15,6% (5)	0,0% (0)	100,0% (5)		
	Idoso	34,4% (11)	36,4% (4)	63,6% (7)		
Raça	EC	90,6% (29)	27,6% (8)	72,4% (21)	-	0,58
	Persa	6,3% (2)	0,0% (0)	100,0% (2)		
	Exótico	3,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
Tipo de pelagem	Curta	90,6% (29)	27,6% (8)	72,4% (21)	-	0,56
	Média	3,1% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)		
	Comprida	6,3% (2)	0,0% (0)	100,0% (2)		
Origem	Doméstico	100% (32)	25,0% (8)	75,0% (24)	-	1
	Gatil	0,0% (0)	-	-		
Habitat	Interior	81,2% (26)	26,9% (7)	73,1% (19)	0,55	1
	Misto	18,8% (6)	16,7% (1)	83,3% (5)		
	Exterior	0,0% (0)	-	-		
Coabitação com cães infetados com <i>L. infantum</i>	Sim	3,1% (1)	0,0% (0)	100% (1)	0	1
	Não	96,9% (31)	25,8% (8)	74,2% (23)		

Anexo XIV (continuação) – Resultados da análise estatística relativamente à associação de possíveis fatores de risco e de sinais compatíveis com LFel com os resultados obtidos pela técnica de qPCR em sangue.

Fator de risco	Categoria	Amostra total (n=32)	qPCR sangue positivo	qPCR sangue negativo	Odds ratio	Valor p
Coabitação com cães saudáveis	Sim	15,6% (5)	60,0% (3)	40,0% (2)	6,1	0,09
	Não	84,4% (27)	18,5% (5)	81,5% (22)		
Profilaxia com ectoparasitícid	Sim	50% (16)	25,0% (4)	75,0% (12)	1	1
	Não	50% (16)	25,0% (4)	75,0% (12)		
Presença de doença	Sim	43,8% (14)	28,6% (4)	71,4% (10)	1,39	0,70
	Não	56,2% (18)	22,2% (4)	77,8% (14)		
FIV	Positivo	4,3% (1)	0,0% (0)	100,0% (1)	0	1
	Negativo	95,7% (22)	22,7% (5)	77,3% (17)		
	NA	28,1% (9)	-	-		
FeLV	Positivo	8,7% (2)	50,0% (1)	50,0% (1)	3,91	0,40
	Negativo	91,3% (21)	19,0% (4)	81,0% (17)		
	NA	28,1% (9)	-	-		
Sinais compatíveis com LFel	Sim	18,8% (6)	0,0% (0)	100,0% (6)	0	0,30
	Não	81,2% (26)	30,8% (8)	69,2% (18)		

Anexo XVI - Caracterização dos animais com resultados positivos pela técnica de qPCR em, pelo menos, uma das amostras biológicas utilizadas (CC e sangue).

Gato	qPCR (NCA)	Concelho	Sexo	Idade	Raça	Habitat	Coabita- ção com cães infetados com <i>L. infantum</i>	Doença
1	CC (598)	Oeiras	M	4 anos	EC	interior	N	Panleu- copénia felina
2	CC (598)	Oeiras	F	6 meses	Persa	interior	N	N
4	CC (1011)	Oeiras	M	10 anos	EC	misto	N	Linfoma renal e FeLV
5	S (880)	Oeiras	M	1 ano	EC	misto	N	N
6	S (1796)	Oeiras	M	13 anos	EC	interior	N	Linfoma intestinal
8	S (1606)	Cascais	M	11 anos	EC	interior	N	<i>Myco- plasma haemofe- lis</i> e IRC
11	CC (1187) e S (1834)	Cascais	F	7 meses	EC	misto	N	N
12	S (1214)	Oeiras	M	8 anos	EC	interior	N	Doença bronco- pulmonar
14	CC (713) e S (3186)	Cascais	F	8 meses	EC	misto	N	N
20	S (1710)	Oeiras	F	8 anos	EC	interior	N	N

Legenda: CC: células conjuntivais; EC: Europeu Comum; F: Fêmea; IRC: Insuficiência Renal Crónica; M: Macho; N: Não; NCA: número de cópias na amostra; S: Sangue.

Anexo XV (continuação) – Caracterização dos animais com resultados positivos pela técnica de qPCR em, pelo menos, uma das amostras biológicas utilizadas (CC e sangue).

Gato	qPCR (NCA)	Concelho	Sexo	Idade	Raça	Habitat	Coabita- ção com cães infetados com <i>L. infantum</i>	Doença
22	CC (140) e S (990)	Cascais	M	1 ano	EC	interior	N	Linfoma renal e FeLV
23	CC (372)	Cascais	M	15 anos	EC	interior	N	IRC
31	CC (502)	Lisboa	F	5 anos	EC	misto	Sim	N
34	CC (297)	Cascais	F	8 meses	Persa	interior	N	N
36	CC (297)	Vila Franca de Xira	F	4 anos	EC	misto	Sim	N
38	CC (499)	Vila Franca de Xira	M	9 anos	EC	misto	Sim	N
40	CC (513)	Vila Franca de Xira	M	7 anos	EC	misto	Sim	N
44	CC (655)	Vila Franca de Xira	F	2 anos	EC	misto	Sim	N
46	CC (275)	Vila Franca de Xira	F	1 ano	EC	misto	Sim	N
49	CC (546)	Vila Franca de Xira	F	1 ano	EC	misto	Sim	N

Legenda: CC: células conjuntivais; EC: Europeu Comum; F: Fêmea; IRC: Insuficiência Renal Crónica; M: Macho; N: Não; NCA: número de cópias na amostra; S: Sangue.